

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

*На правах рукописи*

Яременко Алексей Владимирович

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОДЕГРАДАЦИИ И ТОКСИЧНОСТИ МАГНИТНЫХ  
НАНОЧАСТИЦ В ПРОЦЕССАХ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ОРГАНИЗМОМ

Специальность: 1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

с.н.с., к.ф.-м.н.

Зелепукин Иван Владимирович

Москва

2022

## Содержание

1.	Введение .....	5
1.1.	Постановка задачи .....	9
1.2.	Научная новизна работы .....	9
1.3.	Теоретическая и практическая значимость работы .....	10
1.4.	Положения, выносимые на защиту .....	11
1.5.	Апробация работы .....	12
1.5.1.	Статьи в рецензируемых научных журналах .....	12
1.5.2.	Тезисы конференций .....	13
1.5.3.	Структура и объем работы .....	13
2.	Обзор литературы .....	14
2.1.	Перфузионная модель печени .....	14
2.2.	Формирование белковой короны на наночастицах .....	15
2.3.	Опсонизация и эндоцитоз наночастиц .....	16
2.3.1.	Опсонизация .....	16
2.3.2.	Связывание с макрофагами и эндоцитоз .....	17
2.3.3.	Связывание опсонированных частиц с клетками Купфера .....	18
2.4.	Изменение фармакокинетики НЧ при их сорбции на эритроциты .....	18
2.5.	Суперпарамагнитные наночастицы на основе $Fe_3O_4$ .....	20
2.6.	Применение суперпарамагнитных наночастиц .....	21
2.7.	Синтез магнитных частиц на основе $Fe_3O_4$ .....	22
2.8.	Детекция суперпарамагнитных наночастиц .....	23
2.9.	Изучение циркуляции магнитных наночастиц .....	26
2.10.	Изучение деградации магнитных наночастиц .....	28
2.11.	Влияние процессов биodeградации наночастиц на организм .....	31
3.	Материалы и методы .....	33
3.1.	Материалы .....	33
3.1.1.	Нано- и микрочастицы .....	33
3.1.2.	Синтез наночастиц покрытых цитратом .....	33
3.1.3.	Реагенты .....	33
3.1.4.	Измерения размеров и заряда наночастиц .....	34
3.1.5.	Исследование кристаллической структуры наночастиц .....	34

3.1.6.	Лабораторные животные .....	34
3.2.	Перфузионная модель печени .....	35
3.2.1.	Оборудование и материалы .....	36
3.2.2.	Экспериментальная модель перфузии печени .....	36
3.2.3.	Проведение измерений на модели перфузированной печени .....	37
3.2.4.	Гистологические исследования печени после перфузии .....	39
3.3.	Связывание наночастиц с эритроцитами .....	39
3.3.1.	Выделение эритроцитов и сорбция на их поверхность наночастиц .....	39
3.3.2.	Исследование стабильности комплексов эритроцит-наночастица .....	40
3.3.3.	Зависимость стабильности комплексов от покрытия наночастиц .....	40
3.4.	Исследование комплексов на электронном микроскопе .....	40
3.5.	Исследование кинетики выведения комплексов <i>in vivo</i> .....	41
3.5.1.	Подготовка и введение образцов .....	41
3.5.2.	Запись изменения концентрации частиц в кровотоке .....	41
3.6.	Распределение наночастиц по органам .....	42
3.7.	Доставка лекарства к онкообразованиям в легких .....	42
3.8.	Циркуляция магнитных наночастиц .....	42
3.9.	Дегградация магнитных наночастиц .....	43
3.9.1.	Исследование дегградации магнитных наночастиц <i>in vitro</i> .....	43
3.9.2.	Количественная детекция деградирующих МЧ <i>in vivo</i> .....	43
3.9.3.	Магнитно-резонансная томография (МРТ) .....	44
3.9.4.	Анализ дегградации МЧ с помощью технологии SQUID .....	44
3.9.5.	Гистологические исследования дегградации наночастиц .....	45
3.10.	Изучение влияния биодегградации наночастиц на организм .....	45
3.10.1.	Анализ биораспределения с помощью МРQ .....	45
3.10.2.	Гистология .....	46
3.10.3.	Гематология .....	46
3.10.4.	Биохимический анализ крови .....	46
3.10.5.	ПЦР анализ экспрессии железосодержащих белков .....	47
3.11.	Статистическая обработка .....	48
4.	Результаты и обсуждение .....	49
4.1.	Перфузионная модель и ее применение .....	49

4.2.	Изучение эффективности связывания частиц с клетками крови.....	56
4.3.	Электронная микроскопия комплексов частиц с клетками крови.....	58
4.4.	Изучение циркуляции комплексов эритроцит-НЧ.....	60
4.5.	Исследование биораспределения наночастиц .....	62
4.6.	Изучение биодegradации наночастиц.....	66
4.6.1.	Измерение количества НЧ в печени с помощью МРQ метода .....	66
4.6.2.	Анализ деградации МЧ <i>in vitro</i> .....	68
4.6.3.	Изучение деградации магнитных наночастиц <i>in vivo</i> .....	72
4.6.4.	Факторы, влияющие на деградацию магнитных частиц <i>in vivo</i> .....	77
4.6.5.	Биологические аспекты деградации МЧ <i>in vivo</i> .....	86
4.7.	Изучение влияния деградации МЧ на состояние организма.....	97
4.7.1.	Характеризация используемых наночастиц.....	97
4.7.2.	Циркуляция наночастиц в крови.....	98
4.7.3.	Изменения МРQ контрастирования НЧ при их деградации .....	99
4.7.4.	Зависимость МРТ контрастирования от деградации НЧ.....	100
4.7.5.	Эволюция биораспределения наночастиц в ходе их деградации .....	100
4.7.6.	Влияние деградации МЧ на экспрессию железосодержащих белков .	103
4.7.7.	Гематологический анализ .....	106
4.7.8.	Гистологический анализ .....	107
4.7.9.	Биохимический анализ крови.....	110
5.	Выводы .....	111
6.	Благодарности.....	113
7.	Список сокращений.....	114
8.	Список литературы.....	115

## 1. Введение

Направленная доставка лекарств при помощи наночастиц является развитием тераностического подхода в современной медицине и шагом в осуществлении высокотехнологичной и безопасной медицины будущего [1]. Понимание фармакокинетики наночастиц является важным звеном в этих исследованиях, поскольку определяют не только эффективность, но и безопасность такой терапии.

Данная работа является исследованием, относящимся к области нанобиотехнологий. Ввиду того, что данная область была долгое время технически недоступна для детальных исследований, к настоящему времени накопилось множество вопросов, решение которых необходимо для правильного понимания и анализа экспериментальных данных. Одним из наиболее бурно развивающихся направлений в нанобиотехнологии является синтез различных типов наночастиц как для исследовательских целей, так и для клинического применения. В настоящее время наночастицы используются как средства целевой доставки различных типов лекарственных молекул, в качестве сенсоров для оценки состояния биологических маркеров, *in vivo* как средства детекции широкого круга биологических молекул, вспомогательные контрастирующие элементы в МРТ, КТ и рентгеноскопических исследованиях, средства манипуляции клетками и др.

Однако, несмотря на столь широкий круг применения наночастиц в живых организмах, механизмы взаимодействия наночастиц как с различными типами клеток, так и с целыми органами на данный момент изучены мало ввиду сложности проведения экспериментов *in vivo* и возможности неоднозначной интерпретации полученных экспериментальных данных.

В литературе имеется большой массив данных о том, что большая часть вводимых наночастиц за довольно короткие промежутки времени аккумулируется в печени и впоследствии выводится из организма [2]. Данное явление получило широкое применение в исследованиях, связанных с механизмами работы печени и лечения ассоциированных с ней заболеваний [3]. С помощью различных модификаций наночастиц возможно добиться их специфического захвата не только клетками Купфера, но также и гепатоцитами за счет их предрасположенности к распознаванию инородных тел [4]. Механизмы такого специфического захвата широко изучены и довольно подробно описаны в литературе [5].

Повышенная аккумуляция наночастиц в печени остается главной проблемой для их широкого применения в исследованиях и терапии заболеваний, которые затрагивают

другие внутренние органы. Таким образом, способность печени к быстрому неспецифичному захвату инородных тел накладывает серьезные ограничения на применение методов, связанных с использованием наночастиц.

Известно, что, попадая в кровоток, наночастицы практически моментально связываются с различными биологическими молекулами, которые потом могут сильно влиять на скорость их неспецифического захвата клетками печени. Предполагается, что наибольший вклад в распознавание макрофагами печени наночастиц вносят опсонины – специфичный класс гликопротеинов [6]. Таким образом, зная структуру, механизмы связывания и роль различных опсонин в фагоцитозе, можно было бы модифицировать наночастицы с целью повышения времени их циркуляции в крови и более эффективного использования.

Однако, вопрос механизмов опсонизации и последующего поглощения наночастиц изучен очень слабо. Описаны лишь интегральные исследования, дающие понятие о том, какие молекулы способны связываться с наночастицами, но не раскрывающие роли отдельных типов молекул в фагоцитозе [7]. В литературе не существует экспериментально подтвержденного однозначного мнения о влиянии отдельных типов молекул на кинетику поглощения наночастиц клетками Купфера.

В данной работе предлагается простая и удобная перфузионная модель для изучения фармакокинетики магнитных наночастиц в печени лабораторных животных, которая в значительной мере лишена недостатков традиционной модели за счет использования нового метода Magnetic Particle Quantification (MPQ) [8]. Сочетая в себе высокую чувствительность, бесконтактный характер измерений и способность их проведения практически в любых средах, MPQ является удобным инструментом исследования в масштабе реального времени и значительно расширяет возможности перфузионной модели. В работе показывается, что данная модель хорошо описывает качественное поведение наночастиц с различными коллоидно-химическими свойствами в печени лабораторных животных и может быть использована для дальнейших количественных исследований фармакокинетики наночастиц.

Далее, в работе было изучено как небелковые компоненты крови, например эритроциты способны влиять на фармакокинетику наночастиц. В работе был продемонстрирован способ продления циркуляции и изменения биораспределения наночастиц по органам, основанный на транспортировке наночастиц по кровеносному

руслу путем их сорбции на клеточные мембраны. В основе данного метода лежит использование различных клеток крови, как природных транспортеров наночастиц в организме. Этот подход был вдохновлен исследованиями в результате данных по длительной циркуляции в крови бактериальных патогенов, выстраивающихся в клетки крови. Тем не менее, хотя эритроциты и являются наиболее часто используемым носителем, эта область продолжает сильно развиваться, и для повышения специфичности доставки частиц к пораженным тканям уже используют другие клетки-мишени: лейкоциты, тромбоциты и стволовые клетки.

Интересно, что хотя потенциально связывание частиц с поверхностью клеток крови является универсальным методом для улучшения их фармакокинетики, большинство работ показывают его более низкую эффективность для малых частиц менее 200-нм. В то же время, малый размер частиц оказывается необходимым свойством для многих терапевтических и диагностических наноагентов, т.к., например, иначе они имеют пониженную проницаемость и диффузию в опухоль. В данной работе также подробно изучили эффективность связывания различных типов наночастиц размером менее 200 нм с поверхностью эритроцитов, продление их циркуляции и повышенную результативность доставки в легкие.

Магнитные наночастицы являются многообещающими агентами, которые уже применяются в клинической практике для МРТ-диагностики и гипертермии. Критический параметр, необходимый для продвижения *in vivo* новых магнитных наноагентов является понимание их долговременной судьбы в организме. В данной работе описываются результаты анализа деградации магнитных наночастиц в организме с помощью MRQ метода. Неинвазивность данного метода, широкий линейный диапазон и его нечувствительность к биогенным формам железа позволила впервые провести широкое сравнительное исследование долговременной судьбы 17 типов частиц в организме.

Нами было обнаружено существенное ускорение деградации частиц при уменьшении их гидродинамического размера, замедление биотрансформации при увеличении вводимой дозы наноагента и зависимость разложения от типа полимера, образующего покрытие частицы. Так, среди ряда из 6 гидрофильных полимеров, самую медленную деградацию обеспечивало покрытие из полиэтиленгликоля (время полураспада магнитных частиц 32 дня), а самую быструю – покрытие из полимера глюконовой кислоты (14 дней). Наиболее сильное различие в скорости деградации было связано с

внутренним строением. Покрытие частиц сплошным 10 нм слоем труднорастворимого полистирола замедляло скорость полураспада магнитных ядер с 40 дней до 1 года.

Старение этих наноматериалов *in vivo* может привести к постепенному снижению их контрастных свойств и индуцированию токсичности. В данной работе также описано наблюдение полного жизненного цикла 50-нм магнитных частиц от их введения до полной деградации *in vivo* и связанного с этим воздействия на организм. Было обнаружено, что через 2 часа наночастицы были выведены из кровотока, но их первоначальное биораспределение со временем менялось. Через 1 неделю большая часть наночастиц была перенесена в печень и селезенку, где они деградировали с периодом полураспада в 21 день. МРТ и магнитный спектральный подход выявили сохранение контраста в этих органах более чем через 1 месяц после введения. Деградация частиц привела к увеличению количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови из-за высвобождения железа, не вызывая никакой токсичности в тканях. Кроме того, наблюдалось увеличение уровня экспрессии генов Fe-ассоциированных белков, таких как трансферрин, транспортер двухвалентных металлов 1 (DMT1) и ферропортин в печени в ответ на деградацию частиц железа. Более глубокое понимание реакции организма на деградацию частиц может принести новые направления в область проектирования контрастных веществ МРТ.

### 1.1. Постановка задачи

**Целью данной работы** является определение биodeградации и токсичности магнитных наночастиц, а также исследование биологических процессов их взаимодействия с компонентами крови и органами ретикулоэндотелиальной системы.

В рамках данной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. На основе перфузионной модели печени и метода MPQ разработать *ex vivo* способ изучения влияния белковых компонентов крови на поведение наночастиц в сосудистом русле печени.
2. Исследовать влияние физико-химических свойств магнитных наночастиц на эффективность их взаимодействия с эритроцитами.
3. Исследовать влияние параметров связывания магнитных наночастиц с эритроцитами на длительность их дальнейшей циркуляции в кровотоке и биораспределение.
4. Изучить влияние физико-химических параметров наночастиц на процессы их старения и биodeградации в условиях *in vivo*.
5. Оценить влияние процессов биodeградации магнитных наночастиц и продуктов их метаболизма на живой организм.

### 1.2. Научная новизна работы

Предложен новый способ исследования в реальном времени печеночного клиренса наночастиц в изолированной перфузируемой печени, основанный на чрезвычайно точном методе магнитометрической регистрации. Также впервые исследовано влияние различных белковых компонентов крови на выведение магнитных наночастиц из сосудистого русла печени. Наконец, метод был применен для выявления интересного эффекта кратковременного снижения активности макрофагов печени после первого взаимодействия с небольшими количествами наночастиц.

Впервые проведено масштабное исследование взаимодействия библиотеки магнитных наночастиц с эритроцитами. Показана зависимость эффективности связывания магнитных наночастиц с поверхностью эритроцитов от физико-химических свойств частиц. Также впервые продемонстрировано, что долгая циркуляция частиц в кровотоке и

изменение их биораспределения при доставке наночастиц на поверхности эритроцитов могут быть независимыми процессами. В то время, как значительное продление циркуляции наблюдалось только у частиц с высокой адгезией к поверхности эритроцитов, увеличение доставки частиц в легкие работало даже для наноагентов с коротким временем жизни в кровотоке.

Впервые проведено широкое сравнительное исследование долговременной судьбы 17 типов магнитных наночастиц в организме. Показано влияние внутренней структуры, размера, поверхностных полимеров и поверхностного заряда наночастиц на время их деградации в модельном организме.

Впервые описано наблюдение полного жизненного цикла магнитных частиц от их введения до полной деградации *in vivo* и связанного с этим воздействия на организм. Впервые показано, что деградация магнитных частиц может приводить к увеличению количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови из-за высвобождения железа, не оказывая токсичного эффекта на ткани. Кроме того, впервые продемонстрировано увеличение уровня экспрессии генов Fe-ассоциированных белков, таких как трансферрин, DMT1 и ферропортин в печени в ответ на деградацию железосодержащих частиц.

### **1.3. Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанный способ изучения циркуляции наночастиц в изолированной печени, основанный на высокопроизводительной магнитометрии, может быть использован для поиска новых механизмов связывания и выведения наночастиц из кровотока, а также для разработки новых наноагентов, обладающих длительным временем циркуляции.

Результаты исследования взаимодействия наночастиц с эритроцитами демонстрируют высокий терапевтический потенциал подхода транспорта малоразмерных частиц на клетках крови для создания терапии агрессивных и мелкоклеточных типов рака, а также для лечения ряда других острых и хронических заболеваний легких (легочный фиброз, обструктивные заболевания легких, бактериальных и вирусных инфекций легких). Такой подход быстрой, направленной доставки частиц может не только облегчить течение заболевания, но и существенно снизить неспецифическую токсичность лекарств для других органов.

Полученные данные о биодеградации магнитных наночастиц могут быть применимы для теоретической оценки биодеградации и биобезопасности целого ряда магнитных наночастиц на основе ядер магнетита, широко используемых в настоящее время

как в клинике, так и в научных исследованиях. Более глубокое понимание реакции организма на деградацию частиц может принести новые направления в область проектирования контрастных веществ МРТ. Также данные об изменении экспрессии железосодержащих белков в ответ на биodeградацию частиц из оксидов железа могут быть использованы для разработки новых способов управления метаболизмом железа, в частности, для разработки новых высокоэффективных и безопасных способов лечения анемии.

#### 1.4. Положения, выносимые на защиту

1. Предложен способ изучения влияния компонентов крови на скорость выведения магнитных наночастиц в организме, основанный на объединении перфузионной модели печени мыши и метода MRQ, осуществляющего детекцию магнитных наночастиц.
2. Продемонстрировано, что данный подход позволяет корректно описать сравнительную динамику выведения наночастиц различного размера, дозы и химии поверхности, а также динамику выведения НЧ в средах с различной активностью опсонинов. Установлены общие принципы выведения наночастиц из кровотока в условиях *in vivo* и *ex vivo*.
3. Произведено сравнительное исследование взаимодействия магнитных наночастиц с эритроцитами мыши в различных условиях. Показано, что положительный заряд и способность частиц образовывать кластеры на поверхности клеток увеличивает стабильность комплексов частиц с клетками крови, в то время как наличие белков сыворотки в среде – приводит к диссоциации комплексов.
4. В экспериментах *in vivo* исследован потенциал технологии доставки магнитных наночастиц с размером менее 200 нм на поверхности эритроцитов. Впервые показано, что доставка наночастиц на эритроцитах к легким может осуществляться даже без продления циркуляции наночастиц в кровотоке.
5. Всесторонне изучена биотрансформация суперапарамагнитных 100-нм наночастиц FluidMAG-ARA в живом организме. Определена скорость деградации наночастиц, а также обнаружен эффект транспорта железа между различными популяциями клеток и органами *in vivo* в процессе биоразложения наноагентов. Показано, что высвобождение железа в ходе деградации может приводить к изменению уровня экспрессии белков, ассоциированных с транспортом и хранением железа. Определена токсичность биodeградации наночастиц, в частности обнаружено влияние деградации наночастиц на увеличение количества клеток Купфера в печени и на рост гематокрита и количества эритроцитов в крови.

### 1.5. Апробация работы

Основные результаты данной диссертации были представлены на следующих конференциях: 4th International Symposium and School for Young Scientists on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine (Москва, Россия, 2019); 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Копенгаген, Дания, 2018); XXXII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», (Москва, Россия, 2020); International Conference Laser Optics (ICLO) (Санкт-Петербург, Россия, 2018); 62-я Всероссийская научная конференция МФТИ (Долгопрудный, Россия, 2019). По материалам работы было опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах и 6 тезисов конференций.

#### 1.5.1. Статьи в рецензируемых научных журналах

1. **A.V. Yaremenko**, I.V. Zelepukin, I.N. Ivanov, R.O. Melikov, N.A. Pechnikova, D.S. Dzhililova, A.B. Mirkasymov, V.A. Bragina, M.P. Nikitin, S.M. Deyev and P.I. Nikitin Influence of Magnetic Nanoparticle Biotransformation on Contrasting Efficiency and Iron Metabolism // *Journal of Nanobiotechnology*. 2022. На рецензии, доступен препринт: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1946508/v1>
2. I.V. Zelepukin\*, **A.V. Yaremenko\***, M.V. Yuryev, I.N. Ivanov, V.R. Cherkasov, S.M. Deyev, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin Long-Term Fate of Magnetic Particles in Mice: A Comprehensive Study // *ACS Nano*. 2021. Т. 15, № 7. С. 11341–11357. (\* - равный вклад авторов)
3. I.V. Zelepukin\*, **A.V. Yaremenko\***, M.V. Yuryev, A.B. Mirkasymov, I.L. Sokolov, S.M. Deyev, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study // *Journal of Controlled Release*. 2020. Т. 326. С. 181-191. (\* - равный вклад авторов)
4. I. V. Zelepukin\*, **A. V. Yaremenko\***, V. O. Shipunova, A. V. Babenyshev, I. V. Balalaeva, P. I. Nikitin, S. M. Deyev and M. P. Nikitin Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth // *Nanoscale*. 2019. Т. 11. № 4. С. 1636-1646. (\* - равный вклад авторов)
5. I. V. Zelepukin\*, **A. V. Yaremenko\***, E. V. Petersen, S. M. Deyev, V. R. Cherkasov, P. I. Nikitin and M. P. Nikitin Magnetometry based method for investigation of nanoparticle clearance from circulation in a liver perfusion model // *Nanotechnology*. 2019. Т. 30, № 10. С. 105101. (\* - равный вклад авторов)

### 1.5.2. Тезисы конференций

1. **A.V. Yaremenko**, I.V. Zelepukin, V.R. Cherkasov, A. Ringaci, E.V. Petersen, T.V. Yaremenko, A.A. Sizikov, A.V. Yaremenko, A.N. Kozyrina, P.I. Nikitin, S.M. Deyev, M.P. Nikitin, Analysis of nanoparticle uptake in liver by magnetic methods. 4th International Symposium and School for Young Scientists on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine, 2019
2. **А.В. Яременко**, И.В. Зелепукин, А.В. Бабеньшев, Т.В. Яременко, П.И. Никитин, С.М. Деев, М.П. Никитин, Доставка наночастиц на поверхности эритроцитов для терапии онкообразований в легких. Сборник тезисов XXXII Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2020.
3. **A.V. Yaremenko**, A. Ringaci, S.D. Zvereva, T.V. Yaremenko, A.A. Tamgin, D.A. Lifanov, V.R. Cherkasov, M.P. Nikitin, Multifunctional magnetic particle-based nanocarriers with easily modifiable surface for *in vivo* transfection. ICLO, IEEE, 2020
4. А.Г. Кочарян, **А.В. Яременко**, А.В. Лунин, М.П. Никитин, Получение новых многофункциональных наноагентов для биомедицины и исследование их физико-химических свойств. Сборник тезисов XXXII Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2020.
5. I. L. Sokolov, **A. V. Yaremenko**, V. R. Cherkasov, V. A. Bragina, A. V. Vasilyeva, A. A. Tregubov, M. P. Nikitin, Magnetic metal-organic framework nanoparticles and ferrihydrite nanoagents for MRI-contrasting and drug delivery. International Conference on the Scientific and Clinical Applications Of Magnetic Carriers, 2018.
6. А.Г. Кочарян, **А.В. Яременко**, А.В. Лунин, М.П. Никитин, Получение мультифункциональных наноагентов на основе оксигидроксидов железа с включением ионов кобальта и изучение их коллоидно-химических и физических свойств. Труды 62-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 2019.

### 1.5.3. Структура и объем работы

Представленная диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, использованных в исследовании, результатов и обсуждения, выводов, а также списка литературы, включающего 173 источника. Работа изложена на 128 страницах, содержит 53 рисунка и 4 таблицы.

## 2. Обзор литературы

Использование различных типов наноматериалов в биотехнологии и медицине в последнее время неуклонно растет [9]. Наночастицы используются как:

- a. Флуоресцентные биологические метки
- b. Средства доставки лекарственных молекул
- c. Биомаркеры для детекции патогенных организмов и клеток
- d. Средства обнаружения различных белков *in vivo*
- e. Инструменты для изучения ДНК и РНК
- f. Средства для удаления раковых опухолей (гипертермия)
- g. Инструменты деления и очистки биологических молекул
- h. Метки для сортировки и обнаружения различных типов клеток
- i. Контрастирующие вещества для повышения разрешения МРТ изображений
- j. Инструменты для фармакокинетических исследований и др. [10].

Таким образом, наночастицы являются основой множества новых технологий в биологии и медицине. Их широкое применение основано на том, что наночастицы можно легко видоизменять и придавать им нужные свойства [11].

Однако вне зависимости от всевозможных модификаций, попадающие в кровоток частицы довольно быстро покрываются белковой короной [9] и впоследствии выводятся из кровотока печенью [12], что может серьезно ограничивать их функциональность и эффективность.

### 2.1. Перфузионная модель печени

Известно, что печень является главным органом, отвечающим за выведение наночастиц диаметром более 5 нм [13] [14], однако, за-за сложной организации живого организма и большого числа взаимовлияющих факторов, изолированное ее изучение *in vivo* невозможно.

К настоящему времени разработан ряд модельных систем, которые позволяют упростить изучение фармакокинетики наночастиц в печени за счет элиминирования ряда интерферирующих факторов. К ним можно отнести *in vivo* двухфотонную микроскопию [15], перфузионную модель печени [16], модели тканевых срезов [17–19], 3D-сфероиды [20] и 2D-клеточные культуры [21]. Среди этих моделей, перфузионная модель печени имеет ряд преимуществ [22,23] такие как: сохранение структуры и функций органа, максимально

приближенных к условиям *in vivo*, возможность использовать меньшее по сравнению с *in vivo* количество интерферирующих факторов, легкость контроля состава перфузионной жидкости, возможность контроля скорости потоков крови и желчи и т.д.

В то же время, перфузионная модель накладывает ограничения на возможные используемые методы для изучения фармакокинетики наночастиц. В частности, широко используемые люминесцентно-оптические методы для *in vitro* исследования более простых моделей печени (на уровне культуры клеток и плоских тканевых срезов), невозможно применить *in vivo* из-за непрозрачности биоткани и большой толщины исследуемого органа. С другой стороны, большинство традиционных физико-химических методов регистрации наночастиц являются инвазивными и требуют многократного отбора проб и дополнительных манипуляций, часто весьма длительных и трудоемких. В связи с достаточно ограниченным временем жизни органа при использовании перфузионной модели, применение таких методов часто ведет к неоправданно большому расходу лабораторных животных и делает саму методику весьма дорогой и неоправданно сложной.

## 2.2. Формирование белковой короны на наночастицах

Наночастицы могут попасть в организм различными путями: от перорального и внутривенного введения до всасывания через кожные покровы. Однако независимо от пути введения, проникая в организм, наночастицы попадают в различные биологические жидкости и тут же покрываются слоем макромолекул, называемым «коронай». Состав такой короны сильно зависит от размера частиц и их поверхностных характеристик [24], которые и определяют специфическое и неспецифическое связывание различных белков с частицами.

В силу своих характеристик некоторые частицы благодаря сильным взаимодействиям между поверхностью наночастиц и макромолекулами могут иметь достаточно стабильную корону, состоящую из определенного набора белков и мало подверженную изменениям. В противовес им, существуют и частицы, слабо взаимодействующие со своими макромолекулами, что делает их корону менее стабильной и более подверженной различным изменениям, сильно зависящим от текущего окружения. Непрерывно меняясь или оставаясь постоянными, макромолекулы короны определяют поведение самой наночастицы в организме, т. к. именно они распознаются и в дальнейшем взаимодействуют с клетками [7]. Основную роль в таком взаимодействии играют белки и некоторые липопротеины высокой плотности [25].

Короны со слабыми взаимодействиями между макромолекулами и поверхностью частиц ввиду своей подвижности слабо влияют на скорость поглощения и выведения наночастиц, так как даже в случае высокоселективного взаимодействия антиген-антитело, связавшись с рецептором белок короны довольно легко отрывается от поверхности частицы, и она продолжает свое движение [26].

Белковые взаимодействия в пределах слабо меняющейся «жесткой» короны были хорошо охарактеризованы [27], и на основании полученных параметров была разработана теоретическая модель, описывающая динамику формирования белковой короны вокруг некоторых типов наночастиц [28]. Данная модель показывает, что сразу после попадания в кровь наночастицы покрываются слоем альбуминов, однако со временем альбумины вытесняются белками, имеющими большее сродство к наночастицам и меньшую константу диссоциации [28]. Такие белки крепко связываются с поверхностью наночастиц и могут циркулировать в связанном состоянии довольно длительное время. Из-за своих стабильных связей белки жесткой короны нередко являются причиной поглощения частиц клетками.

Взаимодействуя с мембранными рецепторами клеток, они вовлекают наночастицы в фагоцитоз, который является одним из основных механизмов выведения частиц из организма [26].

### **2.3.Опсонизация и эндоцитоз наночастиц**

#### **2.3.1. Опсонизация**

Благодаря уникальным настраиваемым свойствам наночастицы могут в корне изменить способы доставки и дозы многих видов лекарственных средств (ЛС). Пространственная локализация высвобождения связанных с наночастицами лекарств может позволить в разы снизить терапевтические дозы лекарств, тем самым снизив их токсичность и вероятность проявления побочных действий. Настройка времени активации связанного ЛС может позволить синхронизовать этапы лечения с естественными колебаниями концентрации различных веществ в организме, что также сделает лечение более эффективным, а побочные эффекты менее опасными. Для достижения этого необходимо увеличить время циркулирования наночастиц в крови, чтобы они успевали провзаимодействовать с мишенью. Однако из-за множества процессов, основным из которых является опсонизация, достигнуть увеличения времени циркулирования частиц крайне трудно [29].

Опсонизация – это процесс покрытия инородных тел специальными белками опсонинами, которые впоследствии служат сигнальными маркерами для фагоцитов, увеличивая тем самым узнаваемость инородных частиц. После опсонизации инородные тела подвергаются фагоцитозу, в процессе которого они разрушаются и выводятся из организма. Опсонизация, как правило, происходит в крови и может занимать от нескольких секунд до нескольких суток. Механизм активации данного процесса имеет много стадий и еще до конца не изучен, однако основная его часть хорошо описана. Известно, что основными опсонинами являются иммуноглобулины, компоненты системы комплемента такие как С3, С4 и С5, белки крови: ламинин, фибронектин, С-реактивный белок, коллаген I типа и другие [30]. Важность данных белков в процессах выведения инородных тел была неоднократно продемонстрирована *in vivo* как на здоровых животных, так и на животных с подавленной экспрессией белка С3, так животные с заблокированным геном С3 были более восприимчивы к бактериальному заболеванию [31].

Предполагается, что постоянно находящиеся в крови опсонины посредством своего броуновского движения натываются на частицы и связываются с ними благодаря Ван-дер-Ваальсову, электростатическому, ионному, гидрофильному или гидрофобному взаимодействиям. Достаточно того чтобы один из многочисленных опсонов прикрепился к инородному телу, после чего запускается каскад, и другие опсонины моментально сорбируются на поверхности «пойманного» агента, образуя белковую корону, вовлекающую весь получившийся комплекс в фагоцитоз [6].

### **2.3.2. Связывание с макрофагами и эндоцитоз**

Существует несколько типов клеточного эндоцитоза, однако все они основаны на формировании пузырьков из мембраны и попадании сформированных пузырьков в цитоплазму клетки [32]. Фагоцитоз, как один из видов эндоцитоза, используется клетками для поглощения и первичной обработки достаточно больших объектов, таких как, например, бактерии или экзосомы с вирусами. Другим видом эндоцитоза является пиноцитоз, который основан на поглощении клеткой внеклеточной жидкости с растворенными в ней белками, питательными веществами и различными агентами.

Существует множество различных путей регуляции эндоцитоза. Один из наиболее изученных его типов является клатрин-опосредованный эндоцитоз, который долгое время считался единственным, не считая пиноцитоза и фагоцитоза. Однако в течение последних 20 лет был изучен и описан целый ряд новых эндоцитозных механизмов с различными

лигандами и рецепторами, которые получили общее название рецепторно-опосредованных эндоцитозов.

В основном, большинство работ, посвященных описанию поглощения наночастиц, сводятся к рассмотрению механизмов фагоцитоза, макропиноцитоза, клатрин-опосредованного и кавеола-опосредованного эндоцитозов [33].

### **2.3.3. Связывание опсонированных частиц с клетками Купфера**

Клетки Купфера являются печеночными макрофагами и локализируются в непосредственной близости от синусоидов печени. Находясь в тесном контакте с эндотелиальными клетками печени, клетки Купфера имеют возможность взаимодействовать с компонентами крови, что и позволяет им выполнять свою основную функцию [34].

Именно благодаря активному захвату клетками Купфера опсонированных элементов печень играет основную роль в очистке крови от инородных тел. Находясь на стенках синусоидов печени, клетки Купфера с помощью фагоцитоза активно поглощают опсонированные инородные тела из артериальной и венозной крови, предотвращая тем самым инфицирование и повреждение других органов.

Одну из ключевых ролей в данном фагоцитозе играют Fc-рецепторы [35] и рецепторы системы комплемента, локализованные на мембранах макрофагов [36]. Они связываются с антителами на поверхности наночастиц по высокоспецифичному антиген-антительному механизму и вовлекают наночастицу в фагоцитоз.

В случае отсутствия антител основную роль в опсонизации и связывании инородных тел с макрофагами играет система комплемента. Центральную роль в активации всей этой системы играет белок C3. Сразу после его активации C3-конвертазой он связывается с поверхностью бактериальной клетки или частицы и запускает каскад сборки системы комплемента, состоящей более чем из 20 компонентов. Далее, собранная система уничтожает бактерию или вирус, а остатки и другие C3-опсонированные частицы связываются со специальным C3 зависимым рецептором клеток Купфера CR1g и выводятся из кровотока с помощью фагоцитоза [37].

## **2.4.Изменение фармакокинетики НЧ при их сорбции на эритроциты**

Как было описано выше, быстрое выведение наночастиц из кровеносного русла может сильно ограничивать их применение в условиях *in vivo*. Одним из возможных

способов продления времени циркуляции может быть связывание наночастиц с поверхностью клеток крови [38,39]. Основными кандидатами на роль переносчиков наночастиц являются эритроциты ввиду их высокой концентрации в крови и длительного времени жизни.

Некоторые патогенные микроорганизмы (диаметром 0.2–2 мкм), например, *Haemobartonella felis*, *Mycoplasma suis*, *Plasmodium falciparum* и др. прикрепляются к мембранам эритроцитов и могут циркулировать в таком состоянии неделями [40]. Данный эффект первоначально был использован для увеличения времени циркуляции некоторых лекарственных молекул (ЛМ), путем их ковалентного связывания с поверхностью эритроцитов [41]. Однако такой метод имеет серьезное ограничение ввиду малого количества лекарственных молекул, способных к образованию стабильных комплексов с эритроцитами. Использование наночастиц в данном случае позволяет расширить применение указанного метода к широкому кругу ЛМ, которые могут быть инкапсулированы в частицы.

Связывание наночастиц с эритроцитами может на порядки увеличивать время их циркуляции по кровотоку. К тому же, размеры используемых наночастиц можно варьировать в широком диапазоне [38]. Тогда как обычно для *in vivo* циркуляции используются частицы диаметром не более 150 нм [42–44].

Было показано, что связывание наночастиц с эритроцитами может увеличивать время их циркуляции более чем на 24 часа и изменять их биораспределение, увеличивая поглощение в легких и снижая его в печени и селезенке. Основной гипотезой, объясняющей повышение концентрации наночастиц в легких, является предположение об их «соскребании» с поверхности эритроцитов при прохождении ими узких альвеолярных капилляров (Рис. 1) [39].

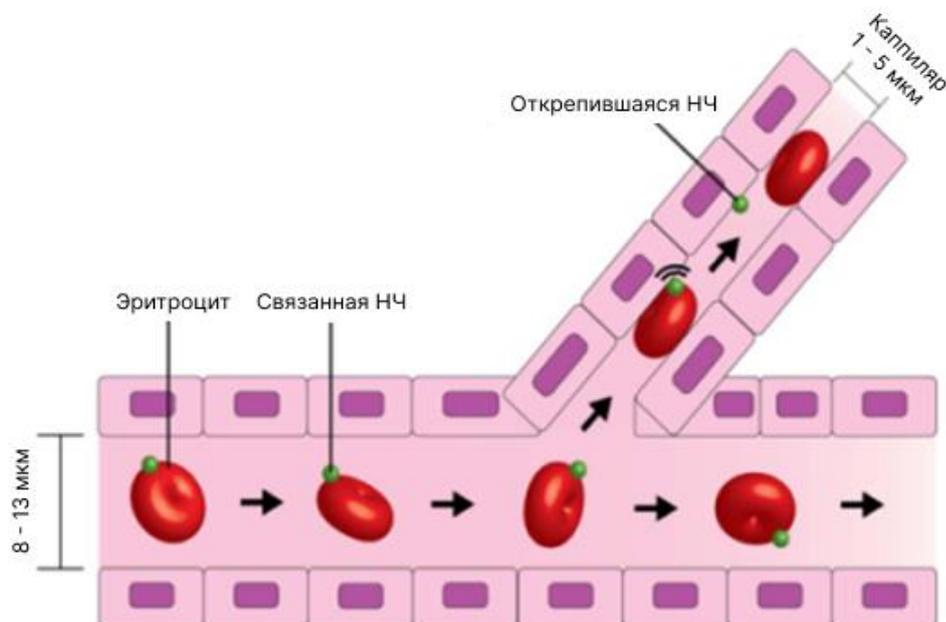


Рис. 1. Механизм «соскребания» наночастиц с поверхности эритроцитов при прохождении комплексов эритроцит-наночастица через узкие капилляры легких (Адаптировано из [39])

Таким образом, маскировка наночастиц на поверхности эритроцитов может сильно улучшать их фармакокинетику и при этом позволяет избегать их поглощения в печени и селезенке, что делает описанный метод привлекательным для разработки новых способов направленной доставки лекарственных молекул.

### 2.5. Суперпарамагнитные наночастицы на основе $Fe_3O_4$

Особую роль в нанобиотехнологии сейчас играют магнитные наночастицы, состоящие из парамагнитного ядра и полимерной оболочки. Благодаря своим уникальным свойствам после введения в организм ими можно управлять без инвазивного вмешательства за счет наложения внешних магнитных полей [45].

Одним из наиболее распространенных типов магнитных частиц являются наночастицы с ядром из оксида двух- и трехвалентного железа  $Fe_3O_4$ . При уменьшении их диаметра менее 128 нм такие наночастицы начинают проявлять суперпарамагнитные свойства [46]. При наложении внешнего магнитного поля эти наночастицы ведут себя как огромные парамагнитные атомы, выстраивая свои магнитные моменты вдоль приложенного поля. После снятия внешнего магнитного поля благодаря броуновскому движению наночастицы быстро полностью теряют свою упорядоченность, и их суммарный магнитный момент исчезает, а так как из-за своих малых размеров каждая отдельная наночастица является однодоменной, то после снятия внешнего поля полностью исчезает и

локальная объёмная намагниченность, что предотвращает образование конгломератов и выпадение частиц в осадок. Все эти свойства делают суперпарамагнитные наночастицы особенно привлекательными для широкого их применения в биотехнологии [47].

## 2.6. Применение суперпарамагнитных наночастиц

В настоящее время благодаря своим уникальным свойствам и низкой токсичности суперпарамагнитные наночастицы широко используются в различных направлениях биотехнологии (

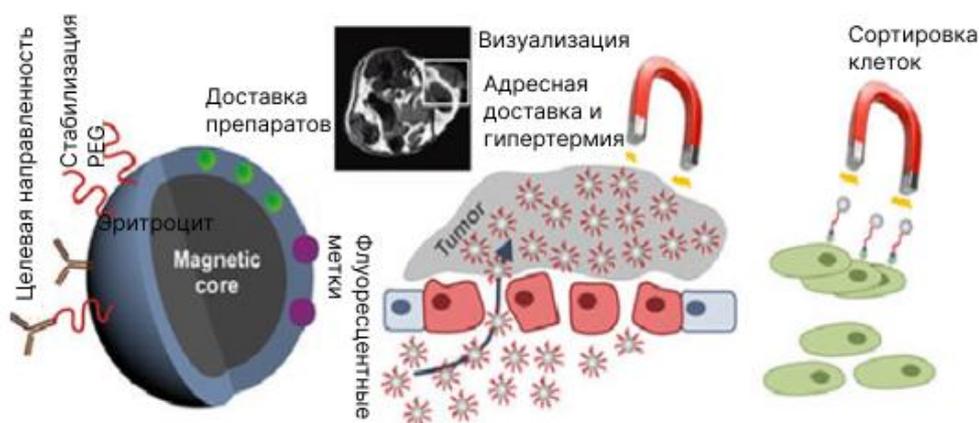


Рис. 2), в том числе и для адресной доставки лекарственных средств (ЛС).

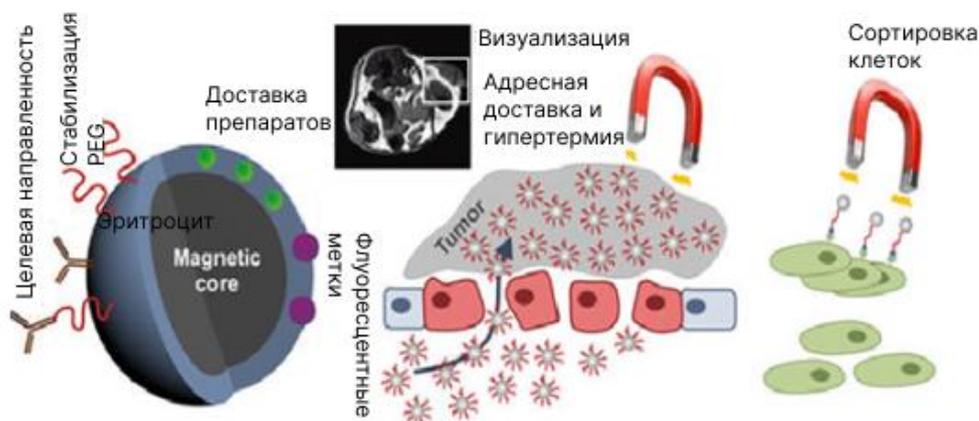


Рис. 2. Применение суперпарамагнитных наночастиц в биотехнологии (приводится по статье А.-Х. Лу [47])

Как правило, использование суперпарамагнитных наночастиц для доставки ЛС осуществляется под постоянным магнитным полем, направленным к пораженному участку. Благодаря чему циркулирующие в кровотоке наночастицы с прикрепленными к их поверхности лекарственными молекулами (ЛМ) постепенно оседают в пораженной области и высвобождают ЛМ (

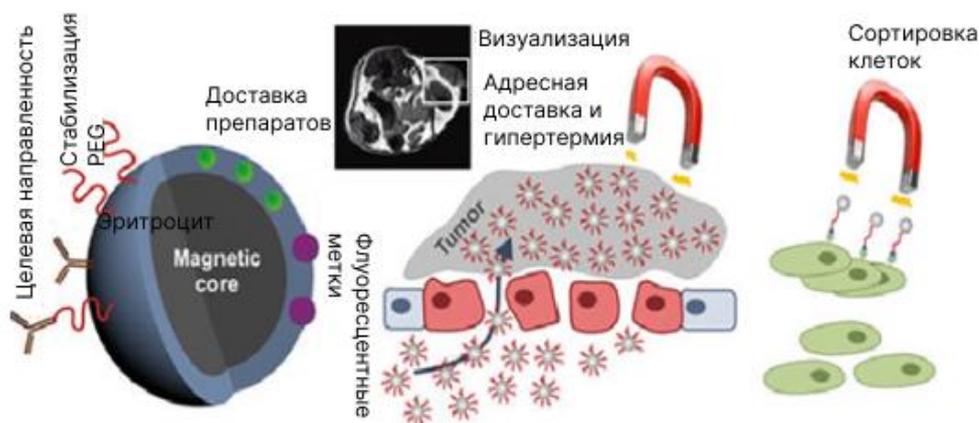


Рис. 2) [47].

Благодаря своим суперпарамагнитным свойствам, описываемые наночастицы можно не только локализовать в какой-либо заданной области с помощью постоянного магнитного поля, но и неинвазивно нагревать путем наложения локального переменного магнитного поля (~250 кГц) (

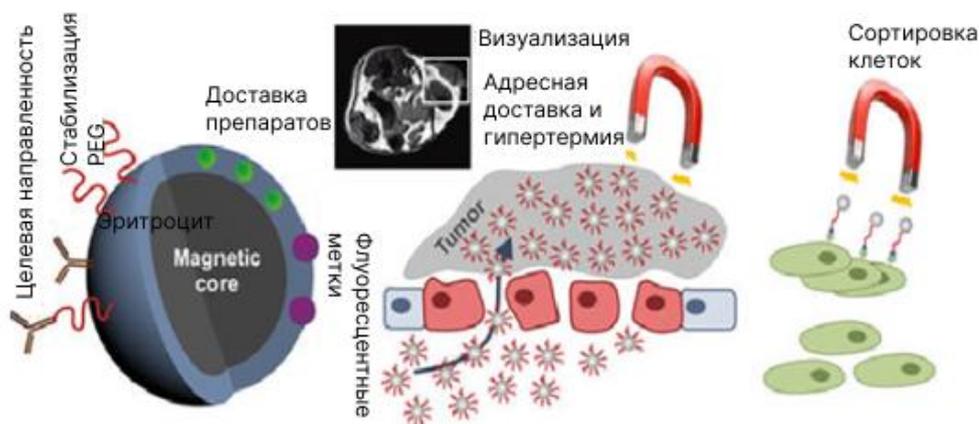


Рис. 2). Данное свойство широко используется в онкологии для нагревания и термического разрушения раковых клеток (гипертермия) [48].

В настоящее время магнитная резонансная томография (МРТ) является одним из наиболее часто используемых, информативных и безопасных средств диагностики опухолевых заболеваний, однако низкая магнитная восприимчивость мягких тканей может сильно снижать качество получаемых изображений. Одним из способов малотоксичного увеличения контраста таких тканей является введение в исследуемую область суперпарамагнитных наночастиц (

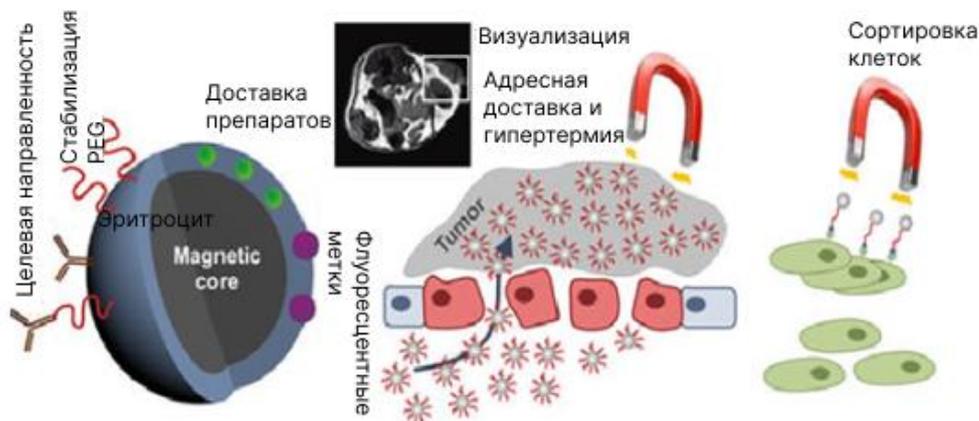


Рис. 2). Введенные частицы уменьшают время релаксации протонов и тем самым увеличивают контрастность получаемых изображений [49].

Нередко у исследователей возникает трудная задача, состоящая в том, чтобы разделить полученную из биоптата клеточную суспензию по типам клеток. Для решения

такой задачи также зачастую используются суперпарамагнитные частицы (

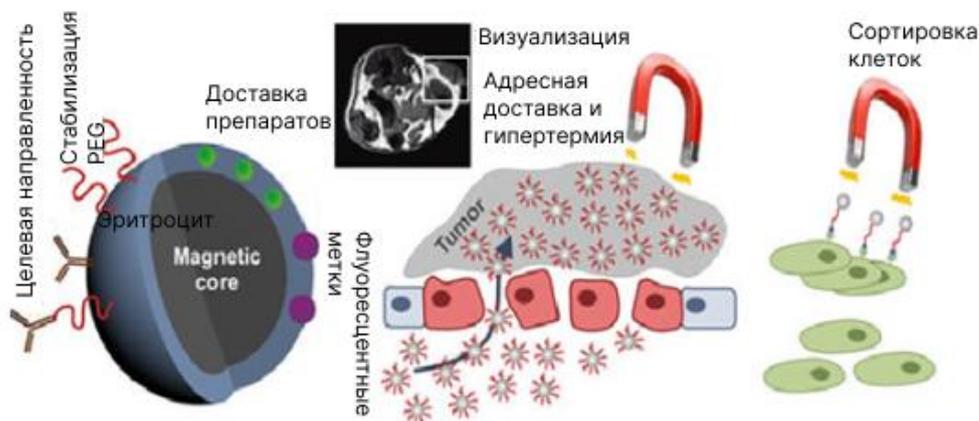


Рис. 2): сначала их поверхность модифицируется высокоспецифичными антителами, после этого частицы связываются с антигенами на поверхности определенных типов клеток и затем суспензия помещается в постоянное магнитное поле. Под действием наложенного поля магнитные наночастицы с прикрепленными к ним клетками перемещаются в заданном направлении и локализуются в определенной области, тем самым отделяясь от остальных клеток [50].

### 2.7. Синтез магнитных частиц на основе $Fe_3O_4$

Одним из наиболее часто используемых методов синтеза наночастиц из железосодержащих оксидов является соосаждение ионов двух- и трехвалентного железа из солевых растворов. Общее ионное уравнение данного процесса можно представить в виде:



Данный метод отличается тем, что в процессе синтеза размер и форму наночастиц можно с высокой точностью регулировать, изменяя концентрации солей, ионную силу раствора, pH раствора, соотношение концентраций  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  и температуру. Также достижение определенных параметров получаемых наночастиц добиваются подбором типов солей и наложением ультразвука.

Таким образом, данный метод позволяет синтезировать наночастицы с незначительным разбросом по размеру и одинаковые по форме, которые в дальнейшем покрываются тонкой защитной оболочкой и могут использоваться для безопасного введения в организм [51].

## 2.8. Детекция суперпарамагнитных наночастиц

Для детекции наночастиц применяется множество различных методов, но в основном все они используются для определения концентрации в каком-либо фиксированном образце и занимают достаточно длительное время. Однако не так давно был разработан и предложен совершенно новый метод детекции суперпарамагнитных частиц – MPQ (Magnetic Particle Quantification), не требующий больших аппаратов и позволяющий измерять постоянно меняющуюся концентрацию таких частиц даже в потоке жидкости.

Принцип данного метода основывается на записи нелинейного ответа суперпарамагнитных наночастиц помещенных в переменное магнитное поле с двумя разными частотами  $f_1$  и  $f_2$ . Ответный сигнал, интенсивность которого пропорциональна количеству наночастиц в образце, детектируется на комбинаторных частотах  $f = mf_1 \pm nf_2$  при изменении силы тока в катушке ( $m, n$  – целые числа, причем  $m^2 + n^2 \neq 0$ ). Наглядная иллюстрация метода представлена на Рис. 3.

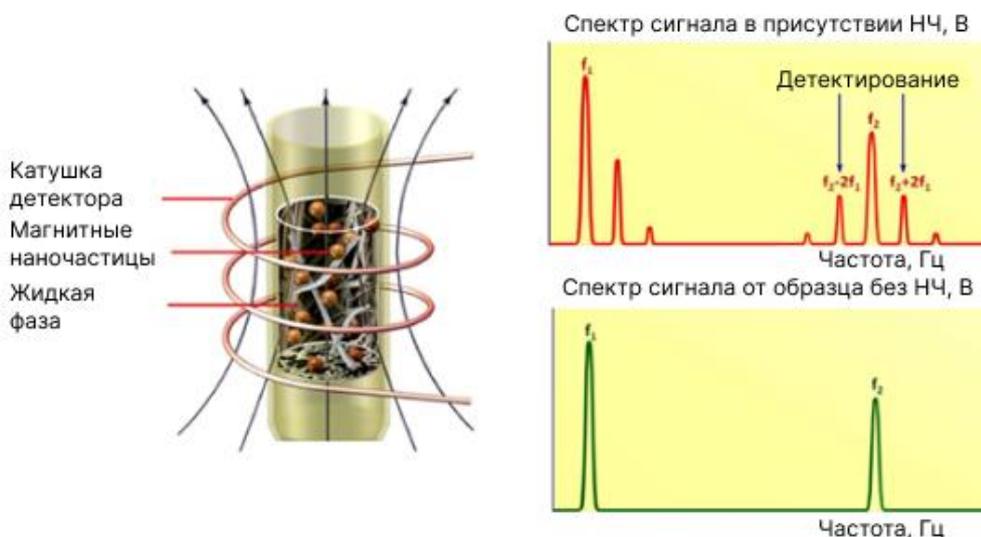


Рис. 3. Детектирование суперпарамагнитных наночастиц с использованием их нелинейного отклика на комбинаторных частотах приложенного переменного магнитного поля (приводится по статье А.В. Орлова [52])

Более детально, magnetic particle quantification (MPQ) метод позволяет детектировать магнитные материалы с нелинейной кривой магнетизации  $M(H)$ . Измерительная катушка используется для измерения электродвижущей силы  $\mathcal{E}(t)$  индуцируемой наложением внешнего переменного магнитного поля и откликом магнитного материала:

$$\mathcal{E}(t) = -nS \frac{\partial B}{\partial t} = -nS \frac{\partial B}{\partial H} \frac{\partial H}{\partial t} = -nS \left( \mu_0 + \frac{\partial M}{\partial H} \right) \frac{\partial H}{\partial t},$$

где  $n$  – количество витков детектирующей катушки,  $S$  – площадь поверхности катушки,  $B$  – амплитуда индукции магнитного поля в катушке,  $\mu_0$  – магнитная постоянная.

В МРQ приборе образцы возбуждаются двухкомпонентным магнитным полем:

$$H = H_1 \cos(2\pi f_1 t) + H_2 \cos(2\pi f_2 t).$$

Первая компонента магнитного поля имеет частоту  $f_1 = 152$  Hz с амплитудой  $H_1 = 47.7$  Oe, в то время как вторая является высокочастотной с частотой  $f_2 = 156$  kHz и амплитудой  $H_2 = 10.3$  Oe. Амплитуды магнитного поля подбираются так, чтобы при их наложении кривая намагниченности образца  $M(H)$  выходила в нелинейную область.

В качестве примера на Рис. 4 показаны кривые магнетизации 11-нм наночастиц из магнетита и ферритина. Диапазон используемого в МРQ приборе поля указан красным. Частицы из магнетита достигают значительной намагниченности и демонстрируют нелинейное поведение кривой  $M(H)$  даже в слабом магнитном поле. В тех же условиях кривые намагниченности ферритина остаются практически линейными, а его намагниченность на несколько порядков ниже. Таким образом, присутствие ферритина практически не влияет на результаты детекции магнетита в образце.

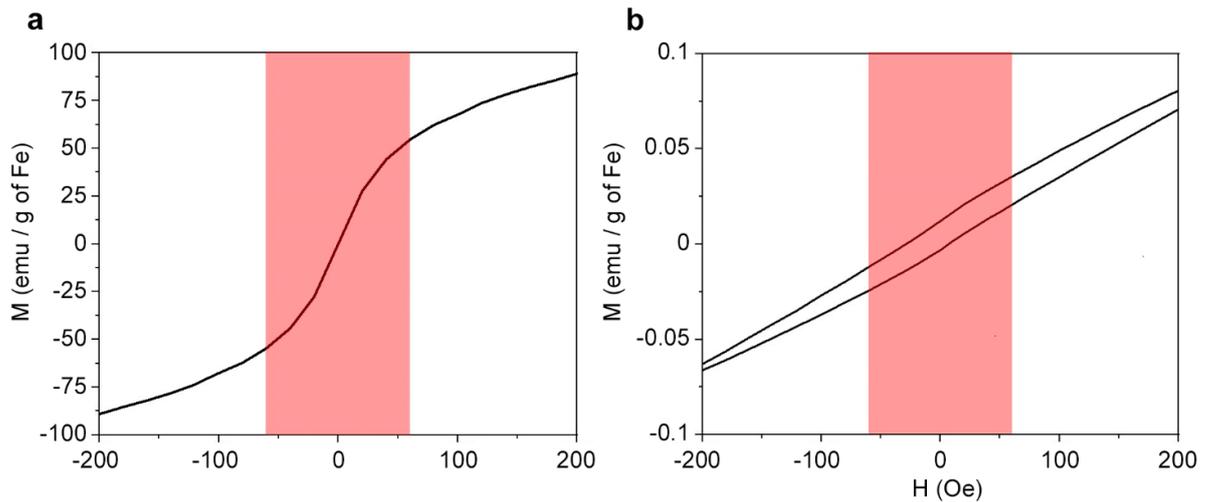


Рис. 4. Кривые намагниченности 11 нм частиц магнетита (а) и белка ферритина (б). Намагниченность была нормирована на количество железа в образцах. Красным отмечен интервал амплитуды магнитного поля в МРQ приборе.

Для диа- и парамагнитных материалов намагниченность линейно зависит от прилагаемого магнитного поля:

$$M(H) = A_1 H(t) = A_1 (H_1 \cos(2\pi f_1 t) + H_2 \cos(2\pi f_2 t))$$

Однако  $M(H)$  нелинейных магнитных материалов может быть разложена в ряд Тейлора. Для описываемых супермамагнитных наночастиц,  $M(H)$  – является нечетной функцией ( $-M(H) = M(-H)$ ), что можно хорошо видеть на представленных экспериментальных кривых на Рис. 4, а также в других работах описывающих измерения данной кривой при комнатной температуре для многих биосовместимых магнитных наночастиц [53,54]. Таким образом,  $M(H)$  ряд будет содержать только нечетные члены:

$$M(H) = A_1 H(t) + A_3 H^3(t) + \varepsilon(H)$$

$$A_3 H^3(t) = \frac{1}{4} A_3 (H_1^3 \cos(2\pi(3f_1)t) + H_2^3 \cos(2\pi(3f_2)t) + (3H_2^3 + 6H_1^2 H_2) \cos(2\pi f_2 t) + (3H_1^3 + 6H_2^2 H_1) \cos(2\pi f_1 t) + 3H_2^2 H_1 (\cos(2\pi(f_1 + 2f_2)t) + \cos(2\pi(f_1 - 2f_2)t)) + 3H_1^2 H_2 (\cos(2\pi(2f_1 + f_2)t) + \cos(2\pi(2f_1 - f_2)t))$$

Фурье спектр  $M(H)$  будет содержать дополнительные гармоники при  $(nf_1 \pm mf_2)$ , где  $n, m$  – целые числа ( $n^2 + m^2 \neq 0$ ). Гармоника  $(f_2 + 2f_1)$  будет первой после  $f_2$ , имея большую амплитуду, чем другие и большее соотношение сигнал/шум для нелинейных магнитных материалов. Таким образом для детекции магнитных наночастиц измеряется  $\varepsilon(t)$  на частоте  $(f_2 + 2f_1)$ . Сигнал усредняется по времени в течение интервала  $(1/f_1)$ .

Также стоит отметить, что МРQ сигнал на гармонике  $(f_2 + 2f_1)$  пропорционален амплитуде 3-й производной функции намагниченности в магнитном поле, используемом в катушке (от -60 Ое до 60 Ое). Увеличение намагниченности образца при сохранении формы кривой, а также растущая нелинейность кривой  $M(H)$  в области (от -60 Ое до 60 Ое) будут усиливать обнаруженный сигнал МРQ от частиц. Следует отметить, что метод МРQ также успешно обнаруживает высокоанизотропные магнитные структуры с гораздо более сложными нелинейными кривыми  $M(H)$  [55].

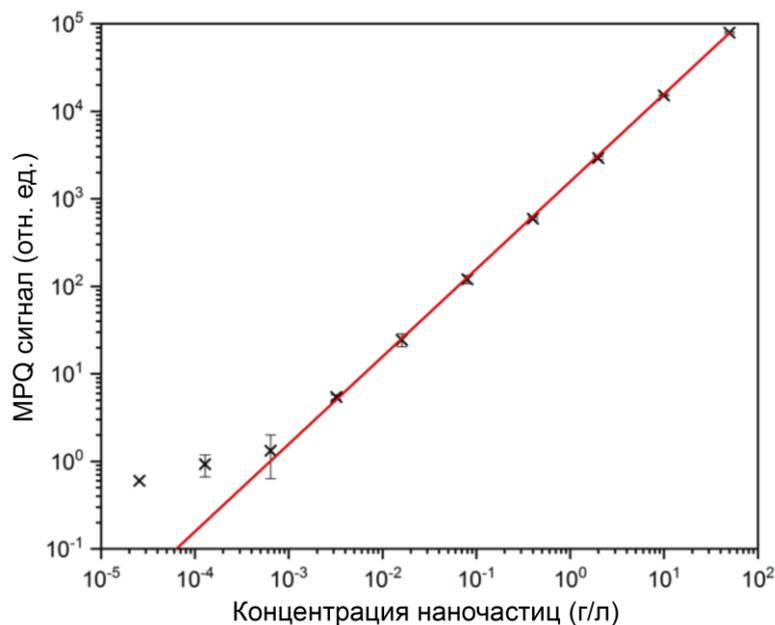


Рис. 5. Калибровочный график прибора MPQ измеренный с использованием различных количеств 50-нм наночастиц FluidMAG-ARA. Для калибровки использовались образцы объемом 60 мкл,  $n = 3$  для каждой точки данных.

Предел детекции данного метода составляет 3 нг  $Fe_3O_4$  на 0,4 мл исследуемой жидкости, а линейная зависимость концентрации наночастиц от интенсивности сохраняется в диапазоне 5 порядков (Рис. 5). Вклад в интенсивности сигнала на комбинаторных частотах от диамагнетиков и парамагнетиков, таких как, например, вода и пластик, на девять порядков ниже детектируемых импульсов, что обеспечивает высокое соотношение сигнал/шум и делает расшифровку полученных с прибора записей однозначной [52].

## 2.9. Изучение циркуляции магнитных наночастиц

Наночастицы активно используются в качестве носителей из-за их большой полезной нагрузки, возможности активного нацеливания и многих других характеристик [56–58]. Наряду с наночастицами используемыми в исследовательских целях описываемыми в множестве научных работ, многие терапевтические и диагностические наноагенты в настоящее время находятся на стадии доклинических и клинических испытаний [59], и некоторые наноагенты уже одобрены для использования в клинике [60,61]. Однако несмотря, на широкое применение и модификации МНЧ их использование имеет свои границы. Так покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ) «стелс» наночастицы уже давно используются в качестве носителей для доставки лекарств [62]. ПЭГ уменьшает

адсорбцию опсоинов на поверхности частиц и предотвращает распознавание и поглощение НЧ макрофагами. Однако несмотря на весьма ценное преимущество длительной циркуляции таких наночастиц [63–65], покрытие их ПЭГ имеет некоторые негативные аспекты. Например, это может привести к развитию иммунного ответа на инъекцию НЧ [66], усложняют проникновение частиц в клетки [67], их последующее высвобождение из эндосом [68] и др. Поэтому последние исследования демонстрируют растущий интерес к проектированию нестелс-наноагентов, не скрывая покрытия на поверхности. Такие наночастицы могут быть высокоэффективными для доставки к опухолям лекарств для терапевтического лечения [69,70], даже если они полностью выводятся из кровотока в течение первых нескольких минут [71,72]. Кроме того, большая часть наночастиц одобренных для лечения человека или протестированная в клинических испытаниях представляет собой непегелированные частицы [60,61].

Для разработки новых наноагентов с диагностическим и терапевтическим потенциалом и продвижения уже эффективно работающих наносистем *in vitro* для медицинского применения необходимо уметь качественно оценивать их фармакокинетику в организме. Информация о динамике их циркуляции в кровотоке и поведении в течение первого часа после приема [73,74] является наиболее важной. Известно, что более длительная циркуляция частиц обычно связана с их лучшим накоплением в опухолях как для пассивных, так и для активных стратегий доставки [75,76]. Кроме того, отклонения циркуляции наночастиц в крови могут быть использованы для диагностики некоторых заболеваний, например, для оценки состояния печени [77] или тяжести тромбоцитопении [78].

Циркуляция наночастиц в кровотоке изучается в основном с помощью различных методов забора крови [79,80]. Эти инвазивные методы, однако, не могут обеспечить временное разрешение, необходимое для анализа поведения многих нестелс-наноагентов.

К тому же инвазивные манипуляции *in vivo* могут влиять на кинетику клиренса частиц, например, из-за уменьшения объема крови в организме, и связанной с этим высокой частотой пульса и изменением артериального давления [81], а также в значительном снижении активности естественных клеток-киллеров [82].

В последнее время появились неинвазивные методы анализа фармакокинетики в режиме реального времени, например, прижизненная микроскопия (флуоресцентная микроскопия [83,84] или оптоакустическая микроскопия [85]). Тем не менее, из-за высоких

фоновых сигналов и требуемой доставки света к наночастицам оба метода в первую очередь предназначены для анализа мелких фрагментов тканей – одного или нескольких поверхностных сосудов [86]. Кроме того, методы предполагают иммобилизацию животных, связанную с повышенным уровнем стресса. Существует несколько неинвазивных магнитных методов анализа фармакокинетики суперпарамагнитных наночастиц (SPIONs) [87–89]. Большинство широко используемых подходов, таких как МРТ [88] и АС susceptометрия [89], калибруются только в узком диапазоне концентраций.

Неинвазивные методы количественных измерений фармакокинетики наночастиц в широком диапазоне концентраций в режиме реального времени еще предстоит разработать. Эта острая нехватка высококачественных методов привела к плохому пониманию фундаментальных аспектов поведения *in vivo* короткоциркулирующих наноагентов.

### **2.10. Изучение деградации магнитных наночастиц**

Как уже упоминалось выше, частицы оксида железа активно применяются в биомедицине из-за уникальных магнитных свойств, позволяющих осуществлять управляемую доставку лекарства и производить их нагрев в переменном магнитном поле [90]. Кроме этого, магнитные наночастицы применяются *in vivo* для тканевой инженерии, клеточного трекинга, активации термо-, механо- и хемо-чувствительных каналов в нейронах, контрастирования тканей, и др. [91–95]. Несколько композиций на основе частиц железа уже допущено в клиническое использование для терапии острой хронической недостаточности железа [96], а также в качестве T2- контрастов для МРТ [97].

Для оценки клинической применимости любых наночастиц важно знать как кратковременные аспекты их поведения в организме – время нахождения в кровотоке, распределение между органами и между клетками внутри органов, так и долговременные – токсичность, скорость биотрансформации материала частиц и экскреции продуктов деградации из организма. Многие исследования, посвященные изучению кратковременной фармакокинетики наночастиц в организме от нескольких часов до нескольких дней [98,99], показали, что кинетика НЧ существенно определяется их покрытием и особенностями формирования белковой поверхности наночастиц. Кроме того, немодифицированные для орган-специфической доставки наночастицы в основном накапливаются в печени и селезенке, двух основных органах мононуклеарной фагоцитарной системы, ответственных за выведение любых наноагентов из кровотока [99–101].

Исследования долговременной судьбы наночастиц из оксидов железа в организме к настоящему времени немногочисленны. В основном, они посвящены изучению деградации наночастиц *in vitro* в условиях моделирующих среду внутри лизосом [102,103], клеточных культурах [104] и сфероидах [105]. Данные работы позволили показать возможные пути биотрансформации магнитных частиц, включающие в себя высвобождение ионов металла, вовлечение в данный процесс комплекса белков отвечающих за метаболизм железа в организме для связывания железа, постепенный переход частиц в форму ферритина и возможности к синтезу частиц де ново из продуктов деградации [106,107]. Однако всесторонние исследования биотрансформаций магнитных наночастиц в организме животных практически не проводились. Редкие исследования показывали влияние одного или двух свойств частиц на их деградацию [108,109], таких как доза частиц, и их покрытие. Например, в работе [110] в течение года наблюдалась зависимость деградации покрытых оксидом железа золотых наночастиц от 2 разных полимеров на их поверхности. В работе [97] изучалась биотрансформация и эволюция магнитных свойств 8 нм частиц в зависимости от введенной дозы. А в статье [109] исследовалась зависимость скорости деградации магнитных наночастиц от состава их белковой короны. Однако из-за многообразия и несогласованности как внешней, так и внутренней структуры наночастиц используемых в различных исследованиях сравнивать между собой разные исследования не представляется возможным. По этой причине, в настоящее время нет однозначных заключений о долговременной фармакокинетике наночастиц в организме.

Одной из проблем, сдерживающих долговременные исследования деградации наночастиц из оксидов железа, являются ограничения методов детекции наночастиц [108]. Для измерения количества оксида железа применяют инвазивные (обычно требующие умерщвления животного) и неинвазивные методы детекции магнитных частиц.

Классические методы, такие как масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS), оптическая эмиссионная спектроскопия (ICP-OES), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ), ферромагнитный резонанс (FMR), электронный парамагнитный резонанс и сверхпроводящий квантовый интерферометр (SQUID) являются инвазивными [111–115]. Для получения репрезентативных данных они требуют тщательной и трудоемкой пробоподготовки образца и большого количества лабораторных животных. Кроме этических вопросов, связанных с оправданностью умерщвления большого количества животных, исследователи могут столкнуться с трудностями

воспроизведения результатов из-за индивидуальных различий животных. Так количество макрофагов, их субтип и, следовательно, активность в биотрансформации материала может зависеть от генетических особенностей линий мышей и общего состояния организма [83,99,116]. При инвазивном анализе фармакокинетики количество частиц в одной временной точке усредняется среди нескольких животных, и при этом теряется информация о профиле деградации наноматериала в каждом конкретном организме.

Также, большинство инвазивных методов анализа оксида железа деструктивны, то есть могут привести к разрушению или повреждению частиц. Пробоподготовка для ICP-MS, ICP-OES требует растворения наночастиц в кислоте, поэтому отличить магнитные частицы от продуктов их деградации невозможно. Это дополнительно повышает нижний порог детекции частиц из-за присутствия в организме эндогенного железа, находящегося на высоком уровне (50 мкмоль/кг) в печени, преимущественно в составе ферритина и гемосидерина [97].

Также среди инвазивных методов стоит отметить просвечивающую электронную микроскопию (ТЕМ). Уникально высокое разрешение метода позволяет отдельно измерять деградацию ядер и оболочки металлических наночастиц и определять трансформацию кристаллической структуры оксидов железа во времени [117]. Данный метод позволил определить основные механизмы, вовлекаемые в биотрансформацию железа в организме [97]. Однако, электронная микроскопия для получения разумного результата *in vivo* требует изучения большого количества клеток разных тканевых локализаций, поэтому неприменима для широких сравнительных исследований долговременной судьбы частиц в организме.

Единственным неинвазивным методом, успешно применяемым для анализа деградации магнитных частиц, является МРТ [118]. Данный томографический метод имеет непревзойденное пространственное разрешение, но он трудно применим для количественной оценки концентрации частиц. Обычно количественные реализации МРТ оказываются линейны в узком диапазоне и не применимы для анализа высоких концентраций магнитных частиц (~мг/г ткани), которые наблюдаются в печени и селезенке сразу после введения наноагента [119]. Кроме того, МР-релаксация сильно зависит от локального микроокружения частиц, которое меняется при их трансформации в организме. Из-за сложностей в калибровке МРТ сигнала *in vivo*, большинство данных по деградации

МЧ получено *ex vivo* измерением магнитной релаксации различных тканей извлеченных из организма [108,120].

Таким образом в настоящее время все еще остро стоит как проблема нехватки всесторонних исследований биodeградации магнитных наночастиц, так и проблема нехватки методов, позволяющих провести данные исследования.

### **2.11. Влияние процессов биodeградации наночастиц на организм**

Магнитные наночастицы (MPs) имеют высокий потенциал в медицине как средства для диагностики, визуализации и терапии различных заболеваний. В настоящее время MPs уже применяются в клинике для лечения железозависимой анемии [60], а также проходят клинические испытания для лечения рака простаты, остеосаркомы и отека роговицы [60]. Также на основе магнитных наночастиц предлагалось создание вакцины против COVID-19 [121]. Начиная с 1996 года суперпарамагнитные частицы используются также и в качестве контрастов для МРТ при диагностике онкозаболевании и поражения печени [122,123].

Для безопасного применения любых наночастиц *in vivo* важно понимать, что с ними происходит в организме от момента попадания в кровоток до их полного разложения и выведения метаболитов из организма. Суперпарамагнитные контрасты обычно представляют собой кристаллы из оксидов железа стабилизированные различными органическими полимерами или инертными неорганическими покрытиями, и могут накапливаться и храниться в организме длительное время [124]. В *in vitro* исследованиях было показано, что магнитные наночастицы способны поглощаться, оставаться и деградировать в клетках от нескольких недель до нескольких лет [125].

Процесс биodeградации наночастиц определяется активной лизосомной средой и ферментативной активностью различных биомолекул [126,127]. Адсорбция белков на поверхность наночастиц в сыворотке приводит к их опсонизации, поглощению клетками и частичной агрегации в лизосомах. После этого химическая коррозия и ферментативная атака на поверхность наночастиц приводят к деградации кристаллов оксида железа внутри клеток [108]. При разложении МЧ может вызываться оксидативный стресс из-за высвобождения  $Fe^{2+}$  железа, а также перегрузка организма несвязанным железом, что усугубляется при быстрой деградации наночастиц [128]. При биodeградации магнитных наночастиц в организме накапливается значительное количество железа, переработанного в биогенную форму, такую как, например, ферритин, благодаря чему МНЧ используются при лечении анемии. Однако избыточное накопление железа может вызывать

гемохроматоз, а также приводить к изменению его метаболизма, в том числе к изменению профиля экспрессии железосодержащих белков и белков-транспортёров железа: ферритина, ферропортина, DMT1, гемоглобина и др. До сих пор неизвестно, как медленная деградация оксидов железа способна влиять на экспрессию белков в организме.

Понимание скорости биodeградации магнитных наночастиц, а также последующего повышения уровня железосодержащих метаболитов *in vivo* важно для оценки диагностического окна МЧ в организме. Продукты распада МЧ, как правило, имеют гораздо меньший магнитный контраст [129] и могут менять свое положение в организме из-за процессов транспорта железа [130]. Кроме того, диагностические возможности спектральных магнитных методик и МРТ могут существенно отличаться. Ранее было показано, что железосодержащие метаболиты могут вызывать долгосрочный контраст МРТ даже после полной деградации наночастиц [129].

Обычно о выведении наночастиц из организма судят по измерению концентрации их компонентов с помощью масс-спектрометрии [131]. Однако данный метод не позволяет отследить процессы внутренней трансформации наночастиц, например изменение их кристалла и магнитных свойств. Так, например, иногда деградация МЧ происходит с изменением магнитной восприимчивости материала, но без изменения их концентрации или даже формы наночастицы [108]. Также, большинство железа, высвобождаемого при деградации, не покидает организм, а переходит в формы ферритина или гемосидерина, что приводит к ослаблению магнитной восприимчивости ткани, однако не влияет на суммарную концентрацию железа в организме, что значительно затрудняет применение этого метода для оценки биотрансформаций магнитных наночастиц в организме [125]. Поэтому видится перспективным производить анализ магнитных свойств наночастиц *in vivo* с помощью магнитных технологий.

### 3. Материалы и методы

#### 3.1. Материалы

##### 3.1.1. Нано- и микрочастицы

Chemicell GmbH, Германия: 50-нм, 100-нм и 200-нм покрытые глюкуроновой кислотой наночастицы fluidMAG-ARA; 50-нм, 100-нм и 200-нм наночастицы покрытые полиакриловой кислотой fluidMAG-PAS; 50-нм, 100-нм и 200-нм наночастицы покрытые карбоксиметилдекстраном fluidMAG-CMX; 100-нм наночастицы покрытые сульфатом полистирола fluidMAG-PS; 100-нм частицы покрытые  $\alpha$ - $\omega$ -дифосфатом полиэтилен гликоля fluidMAG-PEG/P; 100-нм наночастицы покрытые хитозаном fluidMAG-Chitosan. Merck Millipore Co., Франция: Estapor 200-нм магнитные наночастицы, покрытые полистиролом (MН1-020/50); Estapor 200-нм магнитные наночастицы, покрытые полистиролом (M1-020/50). Spherotech, Inc., США: 0.96-мкм частицы функционализированные карбоксильными группами; 1.1-мкм частицы функционализированные аминогруппами.

##### 3.1.2. Синтез наночастиц покрытых цитратом

Наночастицы магнетита с цитратным покрытием синтезировали путем совместного осаждения солей  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  в щелочных условиях. Вкратце, 26,5 мг тетрагидрата хлорида железа (II) и 59 мг гексагидрата хлорида железа (III) растворяли в 1 мл воды. После этого добавляли 125 мкл 30% гидроксида аммония, раствор смешивали и инкубировали в течение 2 ч при 80 °С. Затем магнитные частицы отделяли с помощью магнита, удаляли супернатант и добавляли 250 мкл 2 М азотной кислоты. Через 5 мин наночастицы дважды промывали водой, а мелкие наночастицы, которые не притягивались магнитом NdFeB 2x1x0,5 см, удалялись. Чтобы покрыть синтезированные магнитные наночастицы, их инкубировали со 100 г/л раствора цитрата тринатрия в течение 1 ч при 60 °С, после чего наночастицы промывали от несвязанного цитрата водой с последующим центрифугированием (17 000 g, 15 мин).

##### 3.1.3. Реагенты

Тетрагидрат хлорида железа (II), гексагидрат хлорида железа (III), водный аммиак, азотная кислота, гидроксид натрия, дигидрат цитрата тринатрия, лимонная кислота, тригидрат гексацианоферрата (II) калия, соляная кислота были приобретены у Sigma, США.

Фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS), pH 7,4; 0,1 М цитратные буферы с pH 2,4, 3,0, 4,0, 4,8 или 6,0 были подготовлены согласно стандартными протоколами. Этиловый спирт 95% (ЭКОлаб ЗАО, Россия), гексаметилдисилазан (98%, Acros Organics, Бельгия), альбумин раствор для инфузий 10% (МИКРОГЕН, Россия), 10% забуференный формалином (pH 7.4, БликМедиклПродакшн, Россия), гематоксилин и эозин (ЛенРеактив, Россия), окраска по Перлсу (БиоВитрум, Россия), антитела к фагоцитарному рецептору клеток Купфера CD68 (Cell Marque, США), гепарин (5000 ме/мл, МЭЗ, Россия), глютаральдегид (Molekula, Россия),

#### **3.1.4. Измерения размеров и заряда наночастиц**

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) использовался для измерения гидродинамических диаметров и  $\zeta$ -потенциалов частиц. Все измерения размеров проводились в воде MilliQ.  $\zeta$ -потенциалы анализировали в 10 mM NaCl с концентрацией наночастиц 2,5 г/л. Для анализа необработанных данных использовалась модель Смолуховского.

#### **3.1.5. Исследование кристаллической структуры наночастиц**

Наночастицы магнетита разбавляли в этаноле и сушили под вакуумом. Рентгеновские дифракционные картины из порошка наночастиц были получены с использованием LabX XRD-6000 рентгеновского дифрактометра с X-ray Cu K $\alpha$  источником излучения ( $\lambda = 1.54182 \text{ \AA}$ ) (Shimadzu, Япония) в диапазоне  $2^\circ - 80^\circ$  и скоростью сканирования  $2^\circ/\text{мин}$ .

#### **3.1.6. Лабораторные животные**

В работе использовали: инбредных мышей линии BALB/c (самки, вес 22-25 г), аутбредных мышей линии ICR (самцы, вес 24-28 г) были получены из Пущинского питомника для лабораторных животных (Московская область, Россия). Животные содержались в виварии Института биоорганической химии (ИБХ РАН). Все протоколы исследований были утверждены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных ИБХ РАН. В качестве анестезии использовали внутрибрюшинное введение смеси Золетил (Вирбак, Франция) и Рометар (Биовета, Чехия) в дозировке действующих веществ: Тилетамин-HCl/Золазепам-HCl/Ксилазин-HCl 20/20/1,6 мг/кг. Эвтаназия животных проводилась путем дислокации шейных позвонков.

### 3.2. Перфузионная модель печени

Для преодоления основных ограничений перфузионной модели, в данной работе использовался метод МРQ, который использовался для решения биоаналитических и цитологических задач [132,133]. Используя инновационный подход детектирования магнитного частиц путем регистрации нелинейного отклика на комбинаторных частотах, метод имеет широкий диапазон линейности (до 7 порядков), позволяет детектировать очень низкие концентрации магнитного материала (до 60 зептомолей) в непрозрачных и окрашенных средах в реальном масштабе времени без изъятия образцов из системы и при практически полном отсутствии эндогенного фонового сигнала [134].

В проведенных экспериментах использовался модифицированный протокол перфузии печени, описанный ранее в работах [17, 136]. Все эксперименты проводились при температуре 20°C, показавшей наилучшую выживаемость и функциональность печени при длительной перфузии [137,138]. Схема эксперимента представлена на Рис. 6.

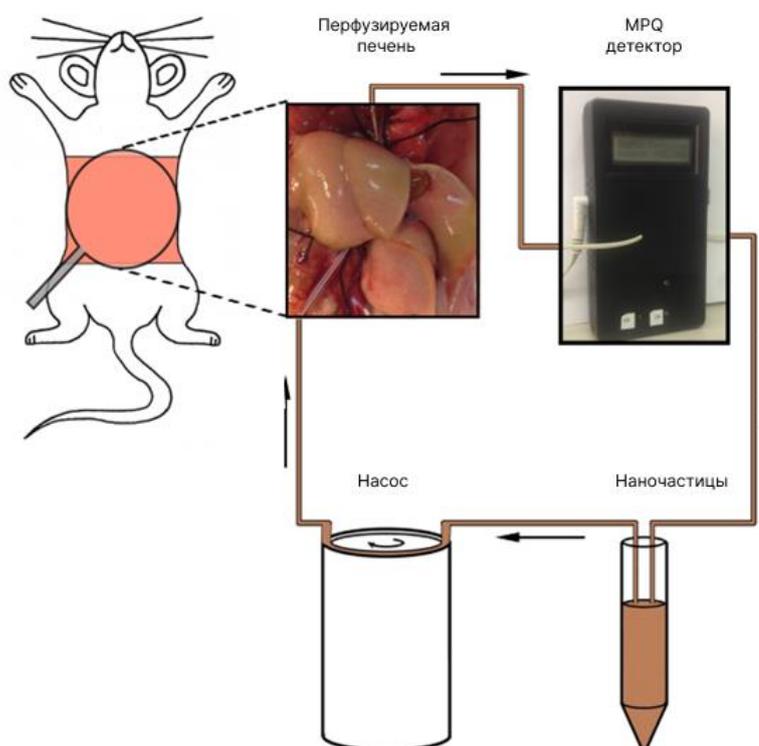


Рис. 6. Схема реализации перфузионной модели печени. Раствор с наночастицами вводился в печень через воротную вену, выводился из нее через заднюю полую вену, анализировался на магнитометре и отправлялся на следующий цикл.

### **3.2.1. Оборудование и материалы**

Для проведения экспериментов использовались: взрослые особи мышей линии ICR, анестезия (Zoletil-100), шприцы на 1 и 10 мл, хирургические инструменты (пинцеты, зажимы, скальпели, ножницы, шовный материал и т. д.), внутривенные катетеры 24G, прозрачный шланг длиной 1 метр, бесконтактный насос с регулировкой скорости потока жидкости (1-100 мл/мин) (HARVARD Aparatus), прибор для измерения текущей концентрации частиц методом MPQ.

### **3.2.2. Экспериментальная модель перфузии печень**

В экспериментах использовался модифицированный протокол, описанный в статье Г.Д. Гейджа [135]. Работы проводились на анестезированных животных. С использованием инсулинового шприца, каждой мышце внутрибрюшинно вводилось 100 мл анестезирующей смеси, и животное помещалось в клетку до полного засыпания, которое констатировалось отсутствием моргательного рефлекса в ответ на легкое прикосновение к роговице глаза.

После того как пропал моргательный рефлекс, мышь закреплялась на операционном столике, в брюшной и грудной областях выстригалась шерсть во избежание ее попадания на операционное поле. Далее, брюшная область обрабатывалась 70% раствором этанола, вокруг брюшной области и области грудной клетки хирургическими ножницами делался круговой надрез и кожный покров удалялся с целью освобождения операционного поля для дальнейших манипуляций.

На следующем этапе аккуратно, не затрагивая крупных сосудов и внутренних органов, хирургическими ножницами и анатомическим пинцетом в направлении от мочевого пузыря к грудной клетке вскрывалась брюшная полость, после чего делалось 4 дополнительных поперечных разреза брюшины, два в области грудной клетки и два в области мочевого пузыря с целью освобождения внутренних органов от ограничений, накладываемых брюшиной. Затем внутренние органы аккуратно сдвигались вправо, а печень влево, что позволяло получить доступ к воротной вене печени (32 на Рис. 7).

После вскрытия брюшной полости в воротную вену печени (32 на Рис. 7) вводился и закреплялся шовным материалом периферический катетер 24G. Затем удалялась основная часть диафрагмы и вдоль всей грудины поперек ребер делался надрез с целью вскрытию грудной клетки и получения свободного доступа к сердцу и задней полой вене (28 на Рис. 7).

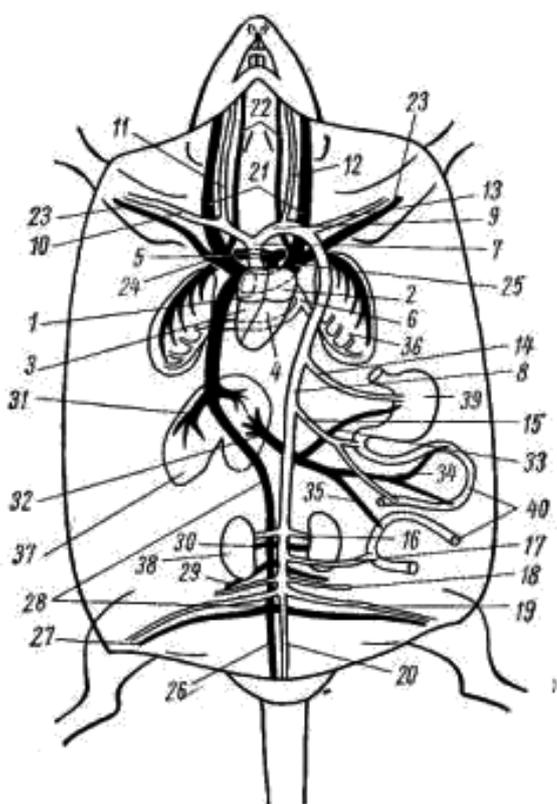


Рис. 7. Схема кровеносной системы крысы (артериальная кровь показана белым цветом, венозная — черным):

1 — правое предсердие, 2 — левое предсердие, 3 — правый желудочек, 4 — левый желудочек, 5 — легочная артерия, 6 — легочная вена, 7 — левая дуга аорты, 8 — спинная аорта, 9 — безымянная артерия, 10 — правая подключичная артерия, 11 — правая сонная артерия, 12 — левая сонная артерия, 13 — левая подключичная артерия, 14 — внутренностная артерия, 15 — передняя брыжеечная артерия, 16 — почечная артерия, 17 — задняя брыжеечная артерия, 18 — половая артерия, 19 — подвздошная артерия, 20 — хвостовая артерия, 21 — наружная яремная вена, 22 — внутренняя яремная вена, 23 — подключичная вена, 24 — правая передняя полая вена, 25 — левая передняя полая вена, 26 — хвостовая вена, 27 — подвздошная вена, 28 — задняя полая вена, 29 — половая вена, 30 — почечная вена, 31 — печеночные вены, 32 — воротная вена печени, 33 — селезеночно-желудочная вена, 34 — передняя брыжеечная вена, 35 — задняя брыжеечная вена, 36 — легкое, 37 — печень, 38 — почка, 39 — желудок, 40 — кишечник. Приводится по книге Н.Н. Карташева [139]

Второй периферический катетер 24G вводился через сердце в заднюю полую вену (28 на **Ошибка! Источник ссылки не найден.**), идущую сквозь печень (кровь из нее в печень не попадает), и закреплялся в ней также шовным материалом (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Таким образом, получалась независимая проточная система.

### 3.2.3. Проведение измерений на модели перфузированной печени

На данном этапе через катетер, закрепленный в воротной вене, с помощью шприца вводилось 10 мл раствора PBS, который выходил из катетера, закрепленного в задней полой вене, промывая внутреннюю область печени от крови и сыворотки.

Таким образом печень готовилась к следующему этапу эксперимента (Рис. 8).

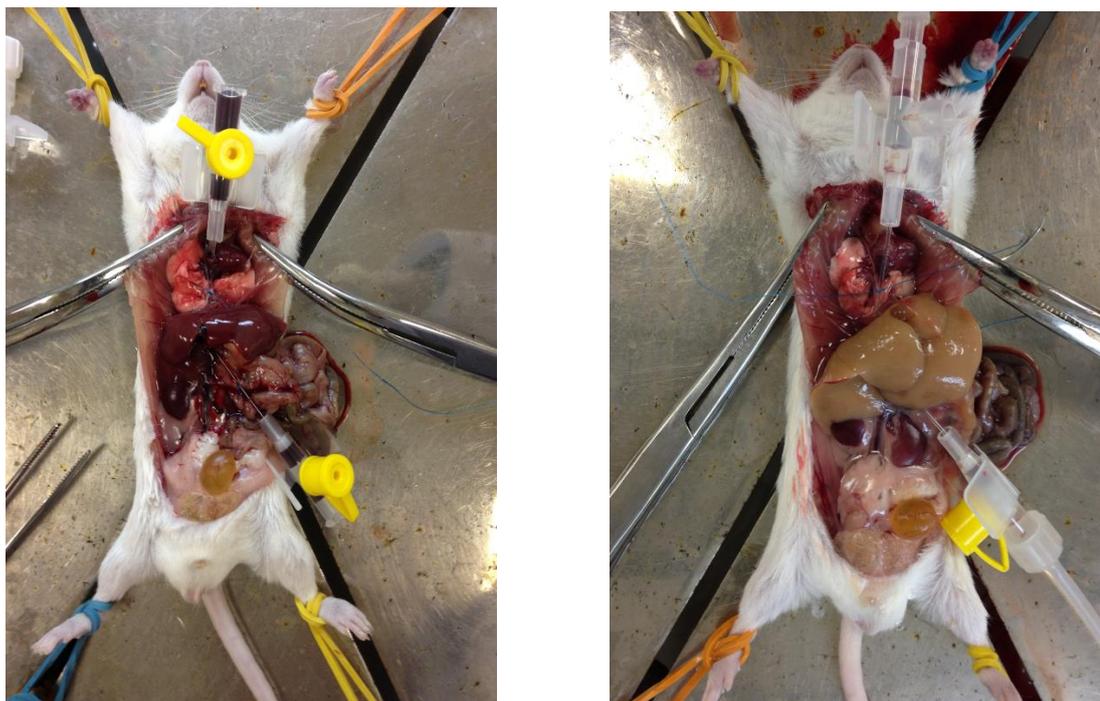


Рис. 8. Введение катетеров, изоляция и промывание от крови печени мыши: *слева* – изолированная печень с кровью; *справа* – перфузированная печень

Далее, шовным материалом пережимались все остальные крупные сосуды, соединяющие печень с другими органами, и повреждалось сердце, с целью остановки потока крови по сосудам. Через некоторое время кровь в сосудах сворачивалась, в результате чего они закупоривались, и можно было считать, что вся вводимая через воротную вену в печень жидкость выходит через полую вену. На этом первая часть, одинаковая для всех экспериментов, заканчивалась.

Во второй части эксперимента к закрепленным в сосудах печени мыши внутривенным катетерам подсоединялась замкнутая (зацикленная на себя) система из шлангов, емкости с частицами (объем жидкости 6 мл), бесконтактного насоса и измерительного прибора (Рис. 8). После чего включался перфузионный насос и медленно прокачивал по кругу жидкость с частицами, постепенно аккумулирующимися в печени. Концентрация частиц измерялась на выходе из печени в течение всего эксперимента, до полного завершения поглощения.

В качестве перфузируемой жидкости с наночастицами использовались: чистый раствор PBS, раствор PBS с альбуминами в концентрации 60 мг/мл и раствор PBS с иммуноглобулинами в концентрации 8 мг/мл.

По завершению поглощения печень извлекалась и проводилось гистологическое исследование удаленного препарата. Также анализировались данные о концентрации, скорости поглощения и количестве осевших в ней частиц, полученные при помощи прибора.

#### **3.2.4. Гистологические исследования печени после перфузии**

Для проведения гистологического исследования сразу после удаления из организма печень фиксировалась 10% забуференным формалином, рН 7.4.

Образцы для дальнейших исследований готовились по стандартному протоколу В.Л. Быкова [140]. Окрашивание производили тремя методами: гематоксилином и эозином (для морфологической оценки состояния печени), по Перлсу и иммуногистохимически с использованием антител к фагоцитарному рецептору клеток Купфера CD68 (для визуализации макрофагов печени).

### **3.3.Связывание наночастиц с эритроцитами**

В ходе эксперимента на поверхность эритроцитов сорбировались наночастицы с различными физико-химическими параметрами, после чего путем помещения полученных комплексов постоянного магнитного поля и проведения отмывок методом центрифугирования изучалась их стабильность.

#### **3.3.1. Выделение эритроцитов и сорбция на их поверхность наночастиц**

Забор крови в объеме 500 мкл проводился из сердца мыши. Образцы крови собирались в пробирки с гепарином для предотвращения свертывания в соотношении 10:1.

Далее производилась отмывка эритроцитов от плазмы крови. Для этого кровь разводилась в 3-5 раз раствором PBS, после чего эритроциты осаждались путем центрифугирования (500g, 3 мин). Для более тщательной отмывки эритроцитов данная процедура повторялась трижды, после чего осажденные эритроциты разводились в растворе PBS до концентрации, соответствующей их концентрации в цельной крови.

На следующем этапе производилась сорбция наночастиц на эритроциты. Для получения достоверных сведений эксперимент производился в трех пробирках одновременно (пробирки на 600 мкл). Вначале, в каждую из них добавлялось по 100 мкл эритроцитов, после чего к эритроцитам добавлялось по 200 мкг наночастиц, разведенных в 20 мкл H<sub>2</sub>O. Полученная смесь тщательно пипетировалась и инкубировалась при комнатной температуре в течение 5 мин.

### **3.3.2. Исследование стабильности комплексов эритроцит-наночастица**

Исследование стабильности полученных комплексов эритроцит-наночастица производилось путем проведения повторных центрифугирований и наложения постоянного магнитного поля.

После инкубации смесь снова пипетировалась, и из каждой пробирки отбиралось по 20 мкл образца для измерения начальной концентрации наночастиц. Далее в каждую пробирку добавлялось по 300 мкл раствора PBS и содержимое пробирок снова пипетировалось, после чего пробирки на 5 минут помещались на постоянный магнит. По истечении пяти минут, не снимая пробирок с магнита, супернатант отбирался и переливался в новые пробирки, после чего производилось центрифугирование (500g, 3 мин). После центрифугирования отбиралось 300 мкл супернатанта, смесь снова пипетировалась и снова из каждой пробирки отбиралось по 20 мкл эритроцитов для измерения магнитного сигнала от налипших на них наночастиц. Данная процедура повторялась трижды, после чего производилось измерение и обработка магнитного сигнала от полученных образцов.

### **3.3.3. Зависимость стабильности комплексов от покрытия наночастиц**

Зависимость стабильности комплексов эритроцит-наночастица от типа полимерного покрытия производилось согласно описанному выше протоколу.

В эксперименте использовались 7 типов частиц размером 100 нм. Поверхности частиц были покрыты карбоксиметилдекстраном (CMX), полимером глюкуроновой кислоты (ARA), полиэтиленгликоль  $\alpha$ - $\omega$ -дифосфатом (PEG/P), полистеринсульфонатом (PS), полиаспартаатной кислотой (PAA), полиакриловой кислотой (PAS) и хитозаном (Chitosan).

## **3.4. Исследование комплексов на электронном микроскопе**

Подготовленные по описанному выше протоколу комплексы наночастиц с эритроцитами в течение 12 часов фиксировались 2,5% раствором глутаральдегида в PBS с доведением концентрации эритроцитов в полученной смеси до 5% от концентрации эритроцитов в крови.

Далее, фиксированные образцы после повторных центрифугирований переводились в 30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 95%, 95% раствор этанола в PBS, время инкубации в каждом растворе составляло 10 мин. Затем смесь снова центрифугировалась, комплексы наночастиц с эритроцитами переводились в 50% раствор HMDS (гексаметилдисилазан) в

этаноле, инкубировались в течение 15 мин при комнатной температуре и после повторного центрифугирования переводились в 100% HMDS.

Спустя 15 мин после перевода комплексов в HMDS пробы объемом 0,3 мкл наносились на подложку и загружались в сканирующий электронный микроскоп для детальных исследований.

### **3.5. Исследование кинетики выведения комплексов *in vivo***

Полученные по описанным выше протоколам комплексы эритроцитов с наночастицами вводились в кровоток лабораторных мышей, после чего с использованием неинвазивного MPQ метода детекции наночастиц изучалась их кинетика выведения из кровотока.

#### **3.5.1. Подготовка и введение образцов**

В эксперименте использовались 100 нм суперпарамагнитные наночастицы четырех типов: с хитозановой оболочкой (Chitosan), с оболочкой из полиглюкуроновой кислоты (ARA), без полимерного покрытия положительно заряженные (UC/C) и без полимерного покрытия отрицательно заряженные (UC/A).

В ходе экспериментов 200 мкг наночастиц разводились в 20 мкл дистиллированной деионизованной воды и добавлялись к 100 мкл эритроцитов разведенных в PBS. Далее полученная смесь тщательно пипетировалась и инкубировалась 5 мин при комнатной температуре. Далее анестезированному животному (мыши BALB/c) в ретроорбитальный синус вводили смесь эритроцитов с наночастицами. В качестве контроля в данном эксперименте в мышью вводилось 200 мкг наночастиц каждого типа разведенных в 120 мкл раствора PBS. С целью получения статистически достоверных результатов каждый эксперимент производился в трех повторах.

#### **3.5.2. Запись изменения концентрации частиц в кровотоке**

Измерения концентрации циркулирующих на поверхности эритроцитов магнитных наночастиц производились с использованием MPQ детектора. Хвост мыши закреплялся в катушке измерительного прибора, после чего в течение 100 мин после введения наночастиц в кровоток с частотой 1 раз в 3 секунды записывался магнитный сигнал от участка хвоста, помещенного внутрь детектора.

Далее, ввиду пропорциональности магнитного сигнала количеству наночастиц в исследуемом образце, делался перерасчет магнитного сигнала в относительную

концентрацию наночастиц и полученные данные обрабатывались с применением статистических методов.

### **3.6. Распределение наночастиц по органам**

Через 100 мин после введения образцов в кровоток мышь умерщвлялась путем дислокации шейных позвонков, после чего магнитометрическим методом производилось измерение концентрации наночастиц в следующих органах: печени, почках, селезенке, легких, сердце, бедренной кости, крови. Также перечисленные органы, за исключением крови, взвешивались и на основании полученных результатов строились распределения частиц по органам.

### **3.7. Доставка лекарства к онкообразованиям в легких**

Исходно мышам линии BALB/c внутривенно вводилось  $10^5$  клеток модельной линии меланомы B16F1. Формирование у животных множественных опухолевых узлов в легких наблюдали в микроскопе на третий день.

Далее мыши разделялись на 3 группы по 5 животных в каждой, первая группа была контрольной, ввиду чего с ней не производилось никаких манипуляций.

Животным второй группы на 3-й и 6-й день развития метастаз вводились 200 мкг наночастиц покрытых хитозаном и проинкубированных с доксорубицином.

Животным третьей группы на 3-й и 6-й день вводились комплексы эритроцитов с наночастицами, предварительно проинкубированные с доксорубицином.

На 9-й день после введения клеток меланомы все мыши умерщвлялись, вскрывались, после чего под микроскопом подсчитывалось количество опухолей в легких каждой мыши и измерялся их объем.

### **3.8. Циркуляция магнитных наночастиц**

Динамика циркуляции наночастиц *in vivo* осуществлялась с помощью MRQ детектора по методике описанной ранее. Регистрация сигнала возбуждения МНЧ проводилась под воздействием магнитного поля:  $f_1=702$  Гц и  $f_2=87$  кГц и амплитудами  $H_1 = 64 \pm 6$  Ое,  $H_2 = 33 \pm 3$  Ое. Сигнал детектировался на комбинаторных частотах  $f_2 + 2f_1$ . Перед измерением животных анестезировали и фиксировали на столике таким образом чтобы не нарушать микроциркуляцию тела. Детекция сигнала проводилась в хвостовых сосудах животного в измерительной катушке MRQ детектора. Введение МЧ проводили

через ретроорбитальный синус в дозе 300 мкг, в качестве растворителя использовали PBS. Максимальный объем введения составил 100 мкл. Детекция сигнала осуществлялась каждые 3 секунды.

### 3.9. Деграляция магнитных наночастиц

#### 3.9.1. Исследование деграляции магнитных наночастиц *in vitro*

Цитратные буферы с различным pH (2,4, 3,0, 4,0, 4,8, 6,0) были получены смешиванием цитрата натрия и лимонной кислоты в различных соотношениях. Затем 100 мкг наночастиц добавлялись к 10 мл буфера и через 0, 1, 3, 7, 14, 21 и 28 дней концентрацию наночастиц измеряли методом окрашивания MPQ, ICP-MS или окраской по Перлсу. Для измерений ICP-MS и по Перлсу наночастицы выделяли щелочно-индуцированной агрегацией при 60 °C центрифугированием (16500 g, 20 мин). Для измерений ICP-MS наночастицы растворяли в концентрированной азотной кислоте, разбавляли в 10 раз и измеряли концентрацию  $^{57}\text{Fe}$ . Для калибровки использовали разбавления соли  $\text{FeCl}_3$ . Для окрашивания по Перлсу - осадок в концентрированной соляной кислоте. Затем раствор разбавляли в воде до достижения 2% кислоты и добавляли равный объем 2% раствора тригидрата гексацианоферрата (II) калия. Через 10 минут интенсивность поглощения измеряли с помощью микропланшетного оптического анализатора Tecan Infinite M1000 PRO.

#### 3.9.2. Количественная детекция деградирующих МЧ *in vivo*

Количественная оценка магнитных частиц проводилась с помощью MPQ-детекторов на основе двухчастотной магнитной нелинейной намагниченности частиц и детектирования индуктивного отклика на комбинаторных частотах. В частности, для исследования биодеграляции использовался детектор MPQ с внешней индуктивной катушкой диаметром 20 мм. Возбуждение магнитных частиц в измерительной катушке детектора осуществляли с помощью переменного магнитного поля при  $f_1 = 152 \text{ Hz}$  и  $f_2 = 156 \text{ kHz}$ , и амплитудами  $H_1 = 47.7 \text{ Oe}$ ,  $H_2 = 10.3 \text{ Oe}$ , соответственно. Отклик детектировался на комбинаторной частоте  $f_2 + 2f_1$ .

Чувствительность магнитной катушки измерялся постепенным сканированием сигнала от магнитных частиц, помещенных в цилиндр с высотой 5 мм и основанием 2.5 мм. Цилиндр передвигался вдоль аксиальной или корональной оси катушки со скоростью 1 см/с и сигнал от частиц регистрировался в реальном времени.

Для регистрации деградации частиц мышь без анестезии фиксировалась в руке и внешняя измерительная катушка МРQ-детектора сканировала область печени. Максимум сигнала в каждый момент измерения использовался в качестве аналога концентрации магнитных частиц. При изучении деградации все сигналы были нормализованы на количество частиц, детектируемое через 1 день после введения частиц. Затем полученные данные усреднялись между различными животными.

Для изучения в режиме реального времени кинетики накопления частиц в печени мыши, животное анестезировалось, после чего располагалась на столике с встроенной в его дно МРQ катушкой. Мышь легко фиксировалась липкой лентой, чтобы малые изменения положения не вносили погрешность в измерение.

Для МРQ исследования биораспределения магнитных частиц у мышей были извлечены органы и ткани и помещены во внешнюю измерительную катушку МРQ-детектора. Интегральный магнитный сигнал от каждого органа нормализовали общим сигналом от всех измеренных органов (печени, селезенки, легких, почек, сердца, мозга, бедренных костей) для учета разницы в фактической введенной дозе между различными животными. Затем каждый сигнал делили на массу органа, чтобы получить сигнал на грамм ткани, после этого полученные данные усреднялись между различными животными.

### **3.9.3. Магнитно-резонансная томография (МРТ)**

Магнитно-резонансная томография проводилась с помощью системы МРТ ICON 1T (Bruker, США) с использованием радиочастотной катушки в который помещалось все тело мыши. Для сканирования использовалась последовательность RARE ( $TR/TE = 3000/8,56$  мс, разрешение 300 мкм,  $FOV = 80 \times 30$  мм, 1 сигнал на скан, 1 повторение, 20 срезов на сканирование, толщина среза 1 мм)

### **3.9.4. Анализ деградации МЧ с помощью технологии SQUID**

Магнитометр MPMS XL SQUID (Quantum Design, США) использовался для измерений намагниченности образцов. Для анализа магнитных частиц в пластиковую трубку помещали 100 мкл МЧ в концентрации 10 г/л, и регистрировали намагниченность в диапазоне амплитуд магнитного поля от -1000 до 1000 Ое. Петлю гистерезиса измеряли в диапазоне от -240 до 240 Ое (включает в себя весь рабочий диапазон методики МРQ). Намагниченность пластиковой трубки, заполненной 100мкл воды, была вычтена из данных

в качестве отрицательного контроля. Затем кривые намагниченности нормализовали до массы железа в образцах, измеренных масс-спектрометрией.

Для анализа ткани печени 1 мг наночастиц, покрытых цитратом, вводили мышам в ретроорбитальный синус. Затем, через 1, 7, 14 и 28 дней после введения частиц мышей эфтаназировали путем дислокации шейных позвонков, печень экстрагировали, взвешивали и замораживали в жидком азоте. Образцы ткани печени известной массы размораживали непосредственно перед измерениями и помещали в пластиковую трубку для анализа. Кривые намагниченности регистрировались на полях от -240 до 5000 Ое, в то время как петля гистерезиса измерялась в области от -240 до 240 Ое. Значения намагниченности нормализовали на массы образцов печени. Из данных вычитали величину намагниченности пластиковой трубки, заполненной 100 мкл воды.

### **3.9.5. Гистологические исследования деградации наночастиц**

Для гистологических анализов мышам вводили 1 мг наночастиц, покрытых цитратом. Затем, через 1, 7, 14, 21 и 28 дней после инъекции, мышей умерщвляли путем дислокации шейных позвонков, печень и селезенку извлекали и фиксировали в 4% формальдегиде в течение 1 дня. После этого органы помещались в парафин, делались гистологические срезы толщиной 5 мкм и окрашивались гематоксилином и эозином, или для визуализации железа проводили окраску по Перлсу. Полученные препараты исследовались с помощью микроскопа Leica DM 4000 с цифровой камерой Leica DFC7000 T (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для каждой исследуемой группы было проанализировано не менее 3 мышей.

## **3.10. Изучение влияния биodeградации наночастиц на организм**

### **3.10.1. Анализ биораспределения с помощью MPQ**

Биораспределение МНЧ проводилось с использованием MPQ детектора. Исходно животным (7 групп, n=3) вводили по 300 мкг FluidMAG-ARA 50 nm nanoparticles через ретроорбитальный синус. На 1, 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дни после инъекции МНЧ животных эфтаназировали и подвергали некропсии с изъятием целых органов: мозг, легкие, сердце, печень, селезенка, почки и кости (бедренная кость с костным мозгом). В качестве контроля служили интактные животные, которым МЧ не вводились. Для регистрации сигнала МНЧ целые органы помещались в катушку MPQ-детектора диаметром 17 мм. Полученный от

каждого органа магнитный сигнал проходил этап нормализации к суммарному сигналу от всех органов одного животного, которые подвергали анализу.

### **3.10.2. Гистология**

Для гистологического анализа у 3 мышей из каждой группы забирались образцы печени, селезенки и почек через 1, 7, 14, 28, и 56 дней после введения НЧ. Полученные образцы фиксировались в течение 1 дня в 4% формальдегиде, а затем помещались в парафин. Срезы делали толщиной 5 мкм, окраску тканей проводили гематоксилином и эозином, а также для визуализации железа - эозином и берлинской лазурью Перлса. Гистоморфологический анализ проводился с использованием микроскопа Leica DM 2500 снабжённого цифровой камерой Leica DFC290 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

### **3.10.3. Гематология**

Гематологический анализ у животных всех групп проводился с интервалами в 1, 7, 14, 28, 42 и 56 день после инъекции наночастиц. В качестве контроля использовали кровь интактных животных. Сбор образцов крови проводили методом прокола лицевой вены в пробирки с ЭДТА-К3 (Guangzhou Improve Medical Instruments, Китай). Анализ параметров проводился в день забора материала с использованием Zoomed 5180 Vet (URIT Medical Electronic Co., Ltd. (Китай)) и набора реагентов от того же производителя. Исследовали следующие параметры крови: общее количество лейкоцитов (WBC,  $10^9/L$ ), общее количество эритроцитов (RBC,  $10^{12}/L$ ), концентрация гемоглобина (HGB, g/dL), гематокрит (HCT, %), средний объем эритроцитов (MCV, fL), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH, pg), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC, g/dl), ширина распределения эритроцитов (RDW\_CV, %), стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов (RDW\_SD, fL), количество тромбоцитов (PLT,  $10^9/L$ ), тромбокрит (PCT, %).

### **3.10.4. Биохимический анализ крови**

Биохимический анализ крови проводился с интервалами в 1, 7, 14, 28 и 42 дни после введения МЧ. Группой контроля служила кровь интактных животных. Для биохимического анализа образцы крови получали из лицевой вены. Кровь собирали самотеком в эппендорфы. Для получения сыворотки кровь в течение 30 минут выдерживали при комнатной температуре, образцы центрифугировали в течение 15 минут в режиме 1800–2200g. День сбора материала образцы были заморожены на  $-20^{\circ}C$  и в последствии

разморожены перед анализом. Результаты биохимических показателей крови были получены с использованием анализатора i-Magic V7 VET (Shenzhen iCubio Biomedical Technology Co., Ltd., Китай) и реагентов (ДиаВетТест, Россия). Исследовали следующие биохимические показатели крови: аспартатаминотрансфераза (AST, IU/L), аланинаминотрансфераза (ALT, IU/L), мочевины (UREA, mmol/L), железо (FE, umol/L).

### **3.10.5. ПЦР анализ экспрессии железосодержащих белков**

Для исследования влияния железных частиц на уровень экспрессии генов, отвечающих за транспорт железа, 12 мышам было введено по 300 мкг наночастиц FluidMAG-ARA. Животных разделили на 4 группы по 3 мыши в каждой и извлекли из них печень через 1, 7, 14 и 28 дней после инъекции. Дополнительно в качестве контроля использовались образцы печени 3 интактных мышей. Органы хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения экспериментов. Далее тотальная РНК была выделена из образцов с помощью реагента ExtractRNA (Евроген) и очищена при помощи CleanRNA Standart kit (Евроген), согласно протоколу производителя. Обратная транскрипция проводилась с использованием 2 мкг выделенной тотальной РНК, 30 pmol Random (dN)10-primer, 30 pmol Oligo(dT)15-primer и 200 U of MMLV обратной транскриптазы (Евроген) согласно протоколу производителя. Для определения уровня экспрессии генов: DMT1, DMT1-(IRE), ферритина (тяжелая и легкая цепи), ферропортина и трансферина – использовался метод ПЦР в реальном времени. RT-PCR реакции проводились в приборе CFX96 (Bio-Rad) с использованием HS Taq DNA Polymerase (Евроген), SYBR Green 1 (Евроген) в качестве флуоресцентного красителя, а также ген-специфичных праймеров (Таблица 1). Для получения относительного уровня экспрессии целевых генов, полученные результаты были отнормированы на уровень экспрессии GAPDH в исследуемых образцах. Эксперимент был проведен в трех технических повторах.

**Таблица 1.** Список ген-специфических праймеров для ПЦР в реальном времени.

	Белок	Forward (5' -> 3')	Reverse (5' -> 3')	PCR (bp)
1	DMT1	TCCCACATTCCTACTGGA GACT	AGAGCAGCTTAAATCCAG CCA	210
2	DMT1-(IRE)	CGTCTGCTCCATCAACAT GТАСТ	GTATCTTCGCTCAGCAGG ACTTTC	207
3	Ферритин (тяжелая цепь)	GAAGCTGCAGAACCAGC GAG	CCTGTTCACTCAGATAAT ACGTCT	215
4	Ферритин (легкая цепь)	ATCTGCATGCCCTGGGTT C	GAGTGAGGCGCTCAAAGA GA	201
5	Ферропортин	CCGAGATGGATGGGTCT CCT	GCCACATTTTCGACGTAG CC	220
6	Трансферин	GCAGTGTCAGAGCACGA GAA	GGCTTCAGGTTGTTTCGGA GT	209
7	GAPDH	TCATGACCACAGTCCAT GCC	ATCCACGACGGACACATT GG	212

### 3.11. Статистическая обработка

Все исследования проводились не менее чем в трех повторах для обеспечения воспроизводимости получаемых данных. Все животные с успешной внутривенной инъекцией частиц были включены в анализ циркуляции, биораспределения или деградации частиц. Данные представлены в виде отдельных измерений, а также в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартное отклонение. Для определения статистически значимых отличий между группами использовался тест Уэлча, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ . Обработка данных производилась с использованием программных пакетов OriginPro 9, Python и Microsoft Excel.

## 4. Результаты и обсуждение

### 4.1. Перфузионная модель и ее применение

Как уже было описано выше, для исследования фармакокинетики частиц в изолированной печени в качестве стандартного объекта изучения были выбраны 100 нм суперпарамагнитные наночастицы магнетита FluidMag-ARA (chemicell GmbH, Germany). Обладая высокой стабильностью в физиологических средах в сочетании с малым размером и отрицательным поверхностным зарядом, такие частицы свободно проходили даже через мелкие кровеносные сосуды и проявляли низкий уровень неспецифического взаимодействия с клетками. Так, МРТ исследования печени как после одного прохода частиц, так и после полного их выведения показали, что МЧ при перфузии распространяются равномерно по всему доступному объему органа и в печени отсутствуют тромбированные сосуды, недоступные для частиц (

Рис. 9а). Эти наблюдения согласуются с результатами гистологического исследования срезов печени: *ex vivo* распределение частиц по ткани не отличалась от их *in vivo* распределения (

Рис. 9б).

При окраске по Перлеу во всех изученных зонах гистологического образца печеночной ткани четко определялось большое количество агрегатов наночастиц, фагоцитированных преимущественно клетками Купфера (

Рис. 9б). Также скопления наночастиц обнаруживаются в эндотелии кровеносных и лимфатических капилляров и, по-видимому, в мелких желчных протоках.

На протяжении всего эксперимента общая структура печени сохранялась, не было выявлено явных признаков токсического поражения и гибели клеток (

Рис. 9с), что косвенно свидетельствует об адекватности перфузионной модели исследования и ее способности корректно описывать процессы элиминирования частиц.

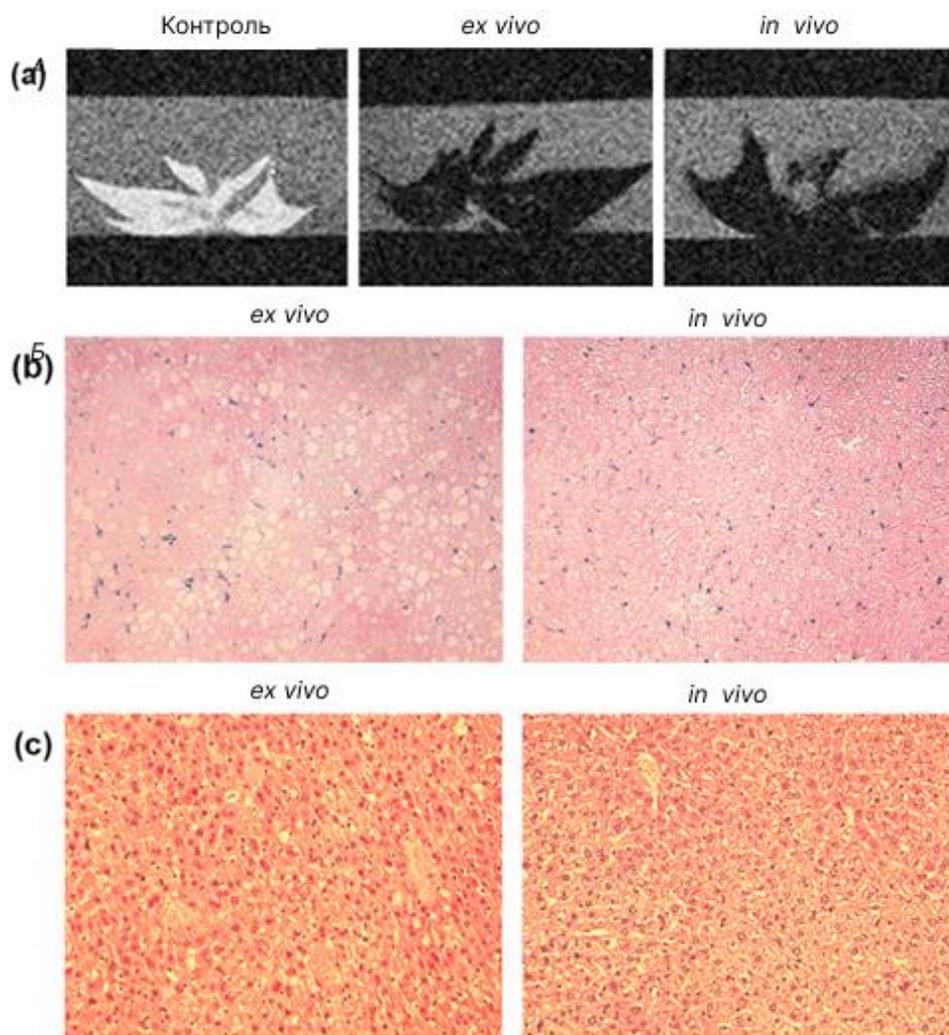


Рис. 9. Биораспределение наночастиц и оценка общего состояния в ходе экспериментов. (a) – Результаты МРТ исследований: *слева* – срез печени без наночастиц (контроль): частицы не наблюдаются; *центр, справа* – срезы печени с наночастицами: наблюдается равномерное распределение наночастиц по всему объему печени; (b),(c) – Результаты гистологических исследований: (b) окраска по Перлсу: обнаруживается большое содержание агрегатов наночастиц, фагоцитированных в основном купферовскими клетками и в меньшей степени эндотелием капилляров, венул и лимфатических сосудов; (c) – окраска ГЭ: Структура печени не изменена, процессов некроза не наблюдается. Увеличение x200.

Использование суперпарамагнитных наночастицы FluidMag-ARA в сочетании с магнитометрическим методом их регистрации в реальном времени позволили нам неинвазивно изучить кинетику выведения частиц. Как видно из рисунка (Рис. 10), стандартный вид кинетики выведения частиц имеет три характерных участка.

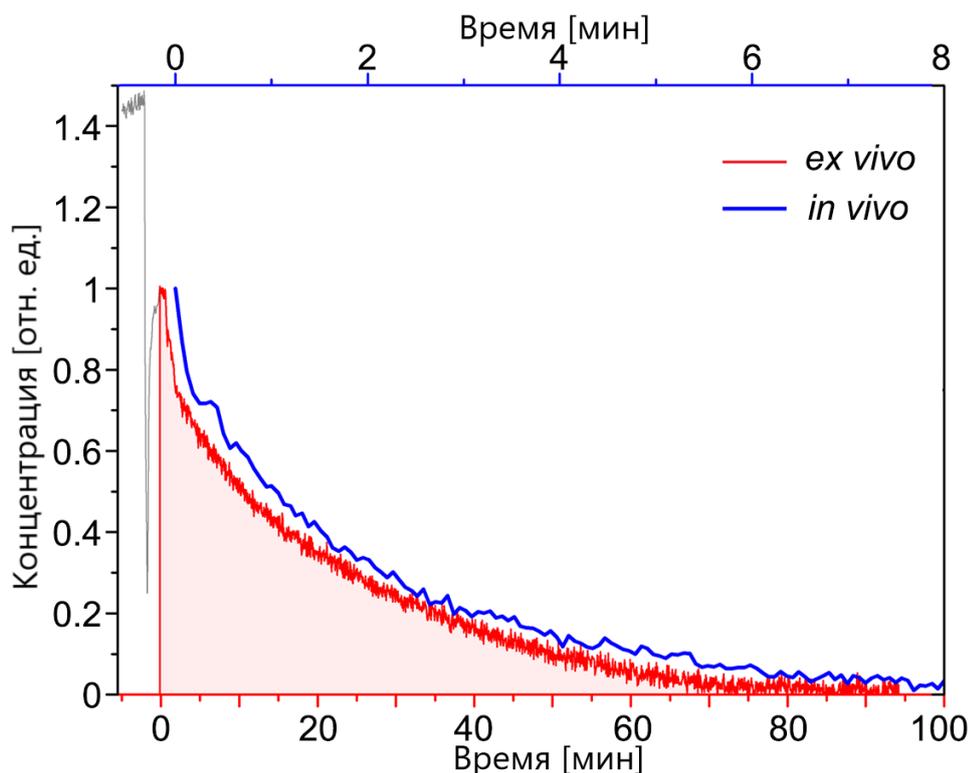


Рис. 10. Результаты МРQ исследований процесса выведения SPION FluidMag-ARA наночастиц: вид типичных кривых выведения в *in vivo* и *ex vivo* условиях;

Первый участок характеризуется постоянным максимальным магнитным сигналом и соответствует прохождению всего объема введенных МЧ через измерительную катушку МРQ ридера. Второй участок кривой начинается с момента резкого падения магнитного сигнала, соответствующего началу прохождения через МРQ катушку фронта рабочего буфера, вытесняемого из печени током МЧ. По мере прохождения этого фронта и начала подмешивания к нему проходящих через печень МЧ, наблюдается постепенное увеличение магнитного сигнала, вплоть до достижения им второго максимума, примерно соответствующего окончанию полного цикла перфузии. Начиная с этого момента, мы наблюдали экспоненциальное падение сигнала от МЧ на третьем участке кривой, происходящее вследствие захвата частиц макрофагами и выведения их из потока.

Следует отметить, что форма кривой *ex vivo* выведения наночастиц была хорошо воспроизводима (Рис. 11) и качественно похожа на кинетику циркуляции *in vivo* тех же частиц, когда все органы, а не только печень, участвуют в их выведении (Рис. 10).

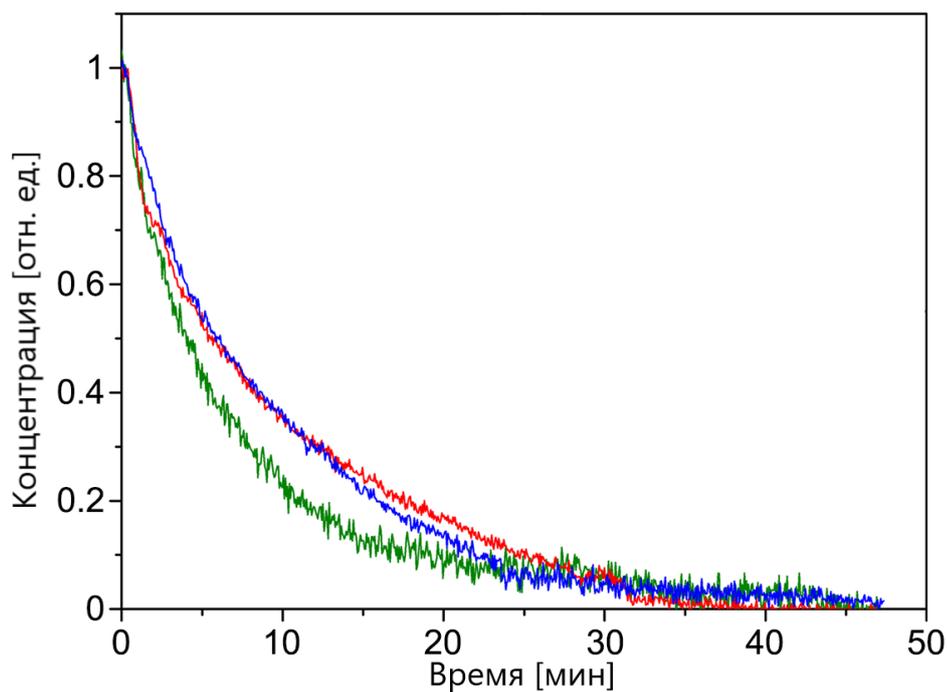


Рис. 11. Результаты МРQ исследований процесса выведения SPION FluidMag-ARA наночастиц: сравнение кривых выведения, полученных для трех различных животных.

Одной из сильных сторон перфузионной модели является возможность не только избежать искажения результатов наблюдений из-за влияния других органов и изучать процесс взаимодействия частиц с печенью в невозмущенном состоянии, но и контролировать другие факторы, например состав перфузируемого раствора. Так, сравнили, как меняется кинетика циркуляции частиц при перфузии печени растворами цельной сыворотки мыши, содержащего полный набор опсоинов, аллогенного мышиноного

и ксеногенного бычьего альбуминов (BSA) (

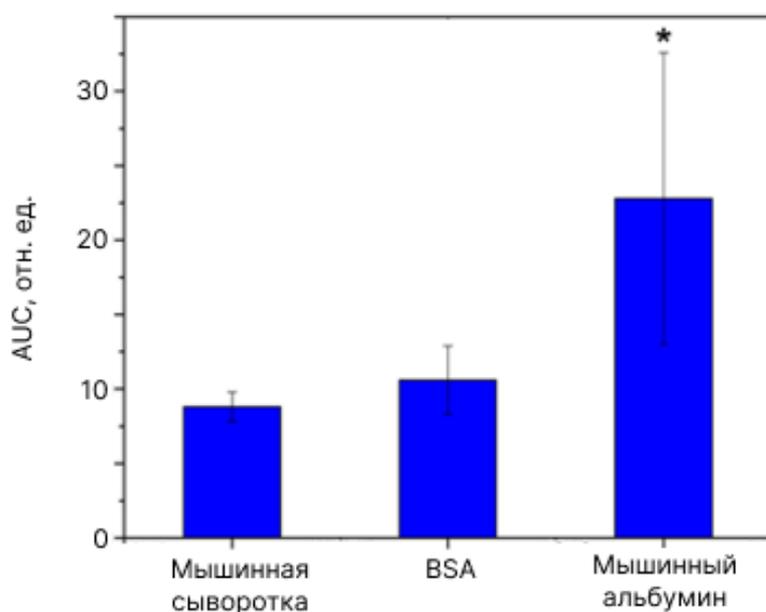


Рис. 12). В качестве параметра оценки и сравнения скоростей выведения, была выбрана часто используемая для этих целей [141] величина интеграла функции кривой выведения (AUC) во временном периоде от момента достижения максимального сигнала до момента выхода кривой на насыщение (прекращения выведения МЧ из перфузата).

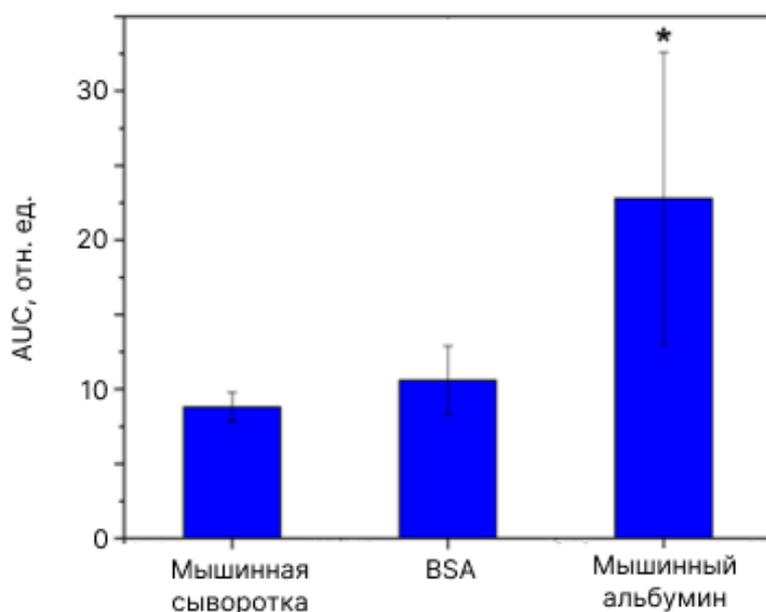


Рис. 12. Сравнение скорости выведения FluidMag-ARA наночастиц из перфузата печенью мыши в зависимости от состава перфузата (диаметр МЧ 100 нм, доза 300 мкг/мышь). Error bars соответствуют стандартной ошибке измерения, \* - обозначает статистически различимые значения ( $p < 0.05$ , критерий Стьюдента).

Как видно из полученных данных, в отличие от цельной сыворотки, использование такого относительно слабого опсонина как аллогенный мышинный альбумин приводит к существенному замедлению скорости выведения частиц. В то же время кинетика циркуляции при использовании бычьего альбумина статистически не отличалась от чистой мышинной сыворотки по времени полного выведения частиц, что говорит, по-видимому, о высоких иммуногенных свойствах этого белка. Поэтому для дальнейших экспериментов, использовали бычий альбумин, как ксеногенный белок, распознаваемый макрофагами так же хорошо, как и опсонины крови, но обладающего значительно лучшей доступностью.

Далее, используя отработанную модель, было проверено насколько правильно данная перфузионная система отражает известные зависимости для циркуляции частиц *in vivo*. Для этого было проведено сравнение кинетики выведения МЧ (ARA) одинакового состава поверхностного слоя (карбоксиметилдекстран), но обладающих разными размерами: 50 нм, 100 нм и 350 нм и введенные в разных дозах: 100 мкг, 300 мкг и 900 мкг на мышь. Как видно из полученных данных (Рис. 13а,б), в случае использования перфузионной модели мы наблюдали заметное ускорение выведения МЧ из кровотока при увеличении их размера с 50 до 350 нм. Данный вид зависимости совпадал с хорошо известными данными *in vivo* [142], при этом отношения AUC этих трех типов частиц *ex vivo* и *in vivo* совпадали в пределах погрешности.

Кроме того, в отличие от *in vivo* экспериментов, *ex vivo* изменение AUC в зависимости от дозы введенных МЧ имело нелинейный характер (Рис. 13б) и при дозе выше 300 мкг/мышь наблюдалось существенное увеличение времени их циркуляции за счет, по-видимому, возникновения эффекта блокировки макрофагов магнитными частицами [143][144].

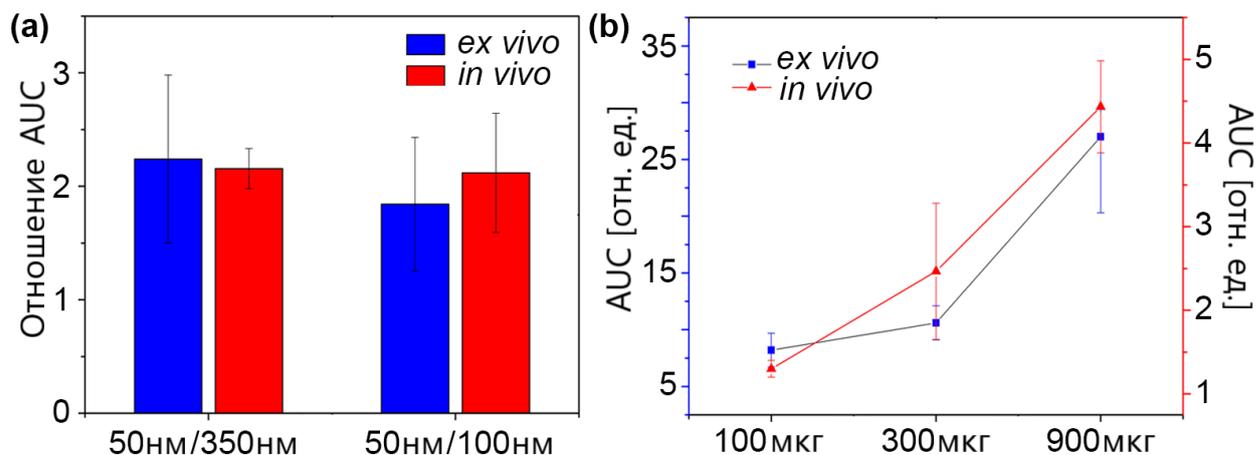


Рис. 13. Сравнение скорости выведения наночастиц из перфузата печени мыши в зависимости от условий эксперимента: (a) от размера наночастиц в *in vivo* и *ex vivo* условиях (доза 300 мкг/мышь, р-р BSA); (b) от величины дозы инъекции наночастиц ( $d=100$  nm, р-р BSA) в *in vivo* и *ex vivo* условиях. Планки погрешностей соответствуют среднеквадратичному отклонению величины.

Интересно, что хотя кинетика выведения МЧ имела, в целом, экспоненциальный характер вида  $C = e^{\beta t}$ , в ходе первого-второго циклов перфузии наблюдалось достаточно резкое падение скорости поглощения частиц макрофагами не зависимо от размеров частиц. Так, например, на Рис. 14 представлена зависимость показателя экспоненты  $\beta$  от времени проведения эксперимента для МЧ диаметром 350 нм и дозе 300 мг/мышь. Очевидно, что в случае идеальной экспоненциальной зависимости данный график должен аппроксимироваться прямой, с увеличением разброса значений последних экспериментальных точек вследствие существенного падения чувствительности метода, а следовательно – и точности приближения.

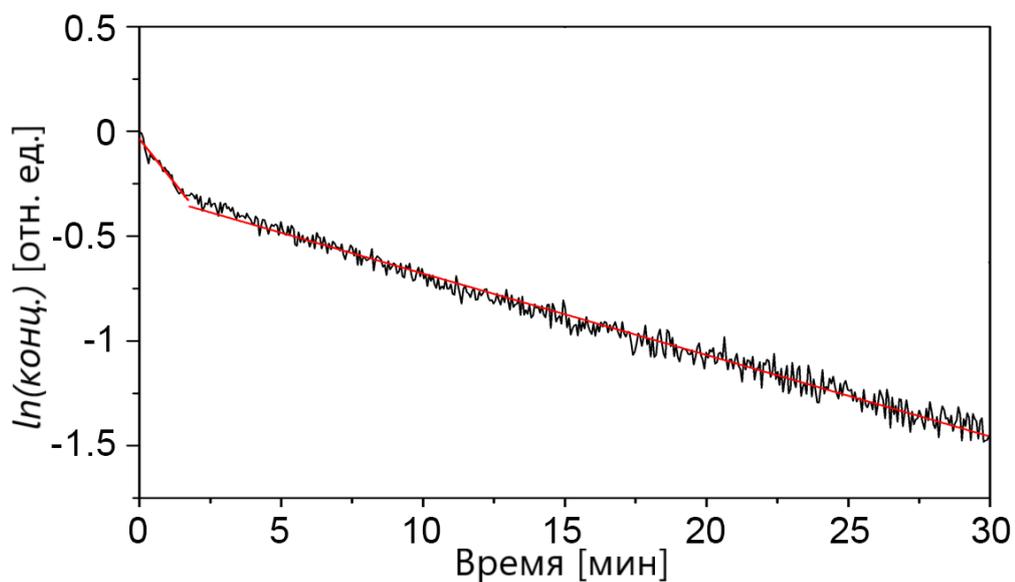


Рис. 14. Сравнение показателей экспоненты функции выведения наночастиц FluidMag-ARA ( $d=50$  nm, доза 300 мкг/мышь) от времени в экспериментах *ex vivo*.

Данную зависимость мы наблюдали и для *in vivo* экспериментов с использованием МЧ 350 nm (Рис. 15), однако в перфузионной модели падение скорости выведения частиц после 1-го цикла перфузии было заметно более выраженным. Такое преобладание данного эффекта в условиях *ex vivo* было нами зарегистрировано во всех экспериментах. Это объясняется, по-видимому, тем, что *in vivo* места детекции и поглощения частиц сильно разобщены, а сами частицы поглощаются в разных органах с разными скоростями, что усредняет их концентрацию и значительно ослабляет эффект.

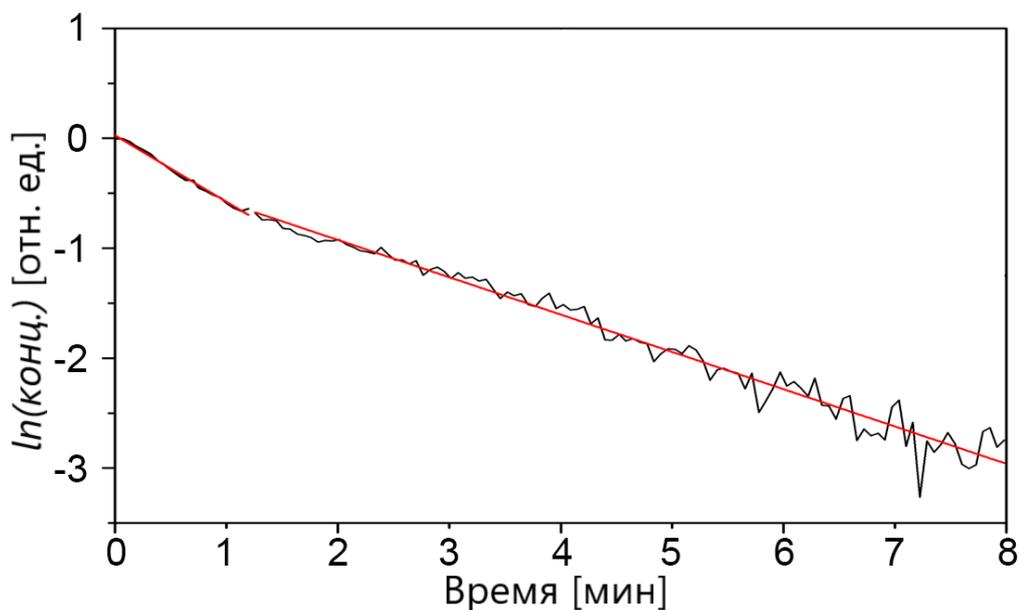


Рис. 15. Сравнение показателей экспоненты функции выведения наночастиц FluidMag-ARA (d=50 nm, доза 300 мкг/мышь) от времени в экспериментах *in vivo*.

#### 4.2. Изучение эффективности связывания частиц с клетками крови

Связывание наночастиц с эритроцитами приводит как минимум к двум эффектам изменения фармакокинетики частиц: продлению их циркуляции в кровотоке и изменению их биораспределения. Оба этих процесса должны зависеть от силы первичного взаимодействия частиц с поверхностью эритроцитов и от константы их связывания в среде кровотока. Поэтому прежде всего нами был проведен скрининг магнитных частиц с разными полимерными покрытиями, зарядами и размерами менее 200 нм, на их эффективность связывания с клетками крови.

Всего нами было протестировано 9 типов частиц с различными покрытиями и было обнаружено, что часть частиц, такие как Chitosan-покрытые МЧ, хорошо связываются и плохо десорбируются с поверхности клеток, другая часть, например, покрытые CMX, ARA или UC/A имеют плохое связывание, хотя существовали и промежуточные варианты (Рис. 16).

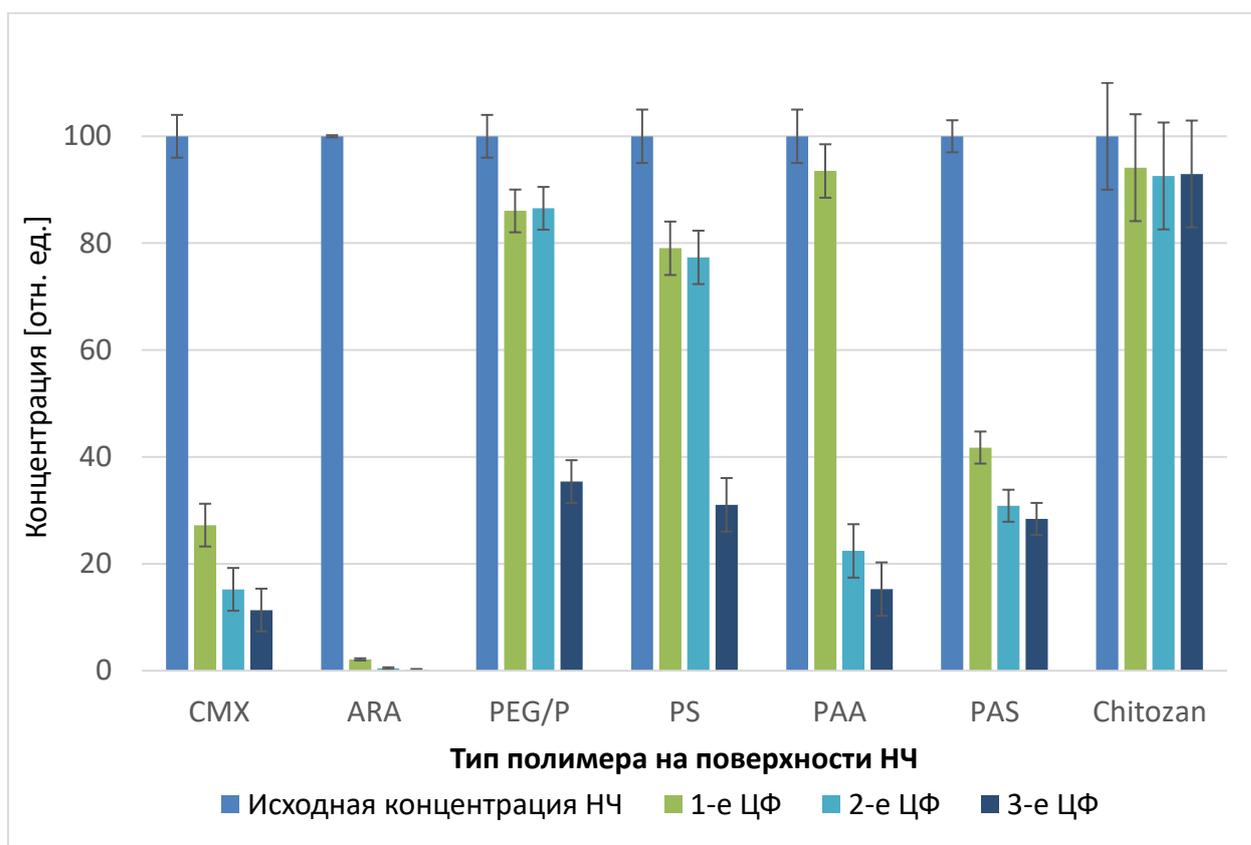


Рис. 16. Зависимость стабильности комплексов наночастиц с эритроцитами от типа полимерного покрытия для НЧ размером 100 нм.

Связывание частиц существенно более сильно зависело от типа полимера, чем от их размера в диапазоне 50-200 нм. Тем не менее, на примере 50, 100 и 200 нм частиц PAS нами было показано, что эффективность связывания возрастает с ростом размера наночастиц. Тем не менее сильнее всего влиял поверхностный Дзета-потенциал. Так, все частицы, которые хорошо связывались и не десорбировались с поверхности клеток при отмывках, имели  $\zeta$ -потенциал более + 40 мВ, в то время как гидрофильные частицы с отрицательным потенциалом были склонны к постепенной десорбции.

Повышенное связывание наночастиц PEG/P с эритроцитами по сравнению с другими отрицательно-заряженными частицами можно объяснить доминированием гидрофобных взаимодействий, приводящих к закориванию частиц на мембране.

Также одной из причин образования стабильных связей быть потеря стабильности частиц, приводящая к их агрегации и преобразованию мультикластеров, которые могут удерживаться на эритроцитах за счет мультивзаимодействий. Так, два исследуемых нами типа частиц UC/A и UC/C не имели полимерного покрытия, и для этих частиц наблюдалась сильная агрегация в физиологических условиях.

Интересно, что связывание частиц с эритроцитами является редким событием при прямом введении частиц в кровотоки, вне зависимости от их свойств. Это может быть связано с быстрым формированием белковой короны вокруг наночастиц. Этот процесс занимает крайне быстрое время (порядка мкс) и способен нейтрализовать или даже перезарядить наночастицы и мешать их связыванию с клетками крови. Например, в наших *in vitro* экспериментах, даже для наиболее крепко удерживаемых частиц FluidMAG-Chitosan наблюдалось существенное уменьшение стабильности образующихся комплексов при добавлении сывороточных белков на стадиях инкубации и отмывки (Рис. 17)

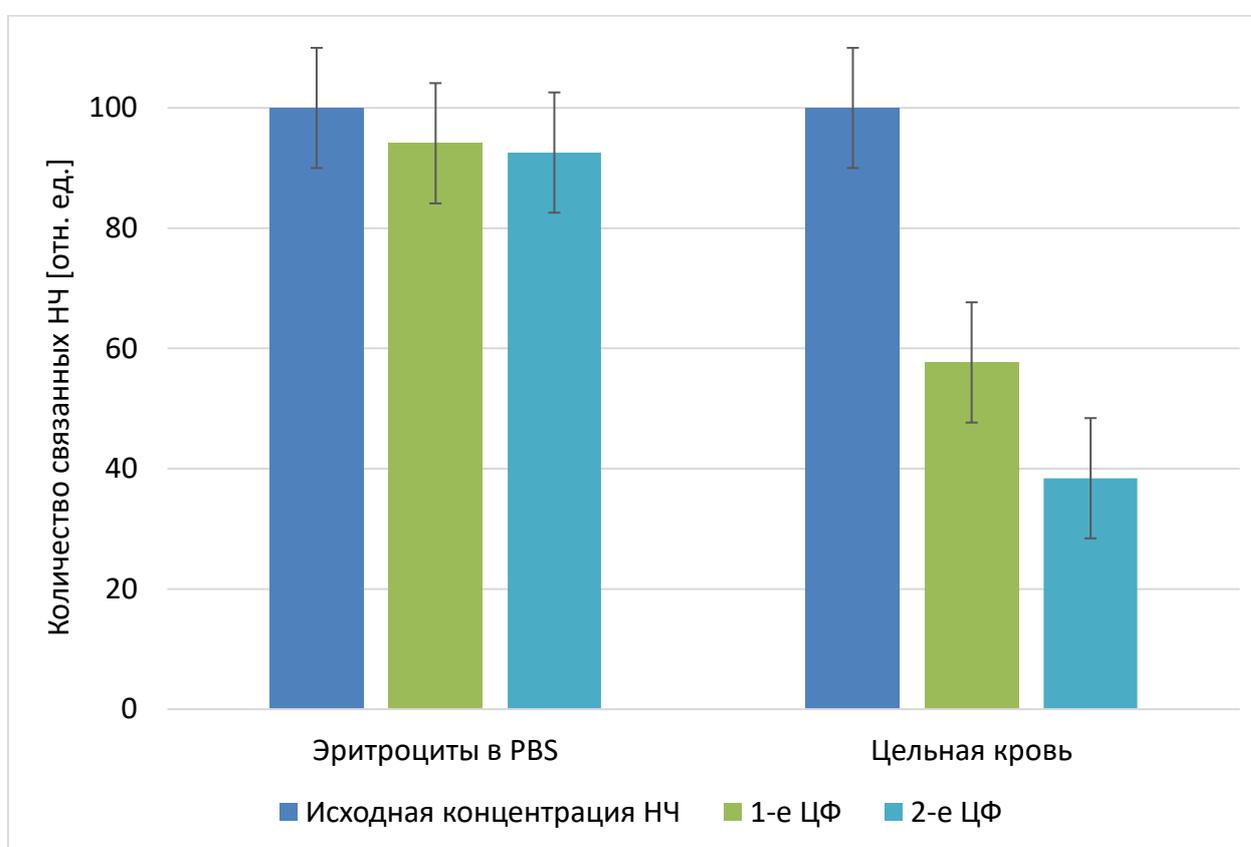


Рис. 17. Зависимость стабильности образующихся комплексов наночастиц с эритроцитами от наличия в среде сывороточных белков на стадии инкубации.

#### 4.3. Электронная микроскопия комплексов частиц с клетками крови

Покрытые и непокрытые частицы проявляют в физиологических условиях кардинально разные свойства, связанные с их коллоидной стабильностью, жесткостью поверхности и т.д. Поэтому для дальнейших исследований нами были выбраны два образца 100-нм частиц с полимерным покрытием: положительные заряженные с покрытием из хитозана, которые хорошо связывались и удерживались на поверхности частиц, и

отрицательно заряженные, покрытые полиглюкуроновой кислотой (ARA), которые проявляли оппозитные свойства. Кроме того, для полного разделения возможного влияния структуры полимера и его заряда, также были выбраны непокрытые UC/A (отрицательно заряженные) и UC/C (положительно заряженные) 100-нм частицы. Взаимодействие данных частиц с эритроцитами было визуализировано с помощью сканирующей электронной микроскопии (Рис. 18).

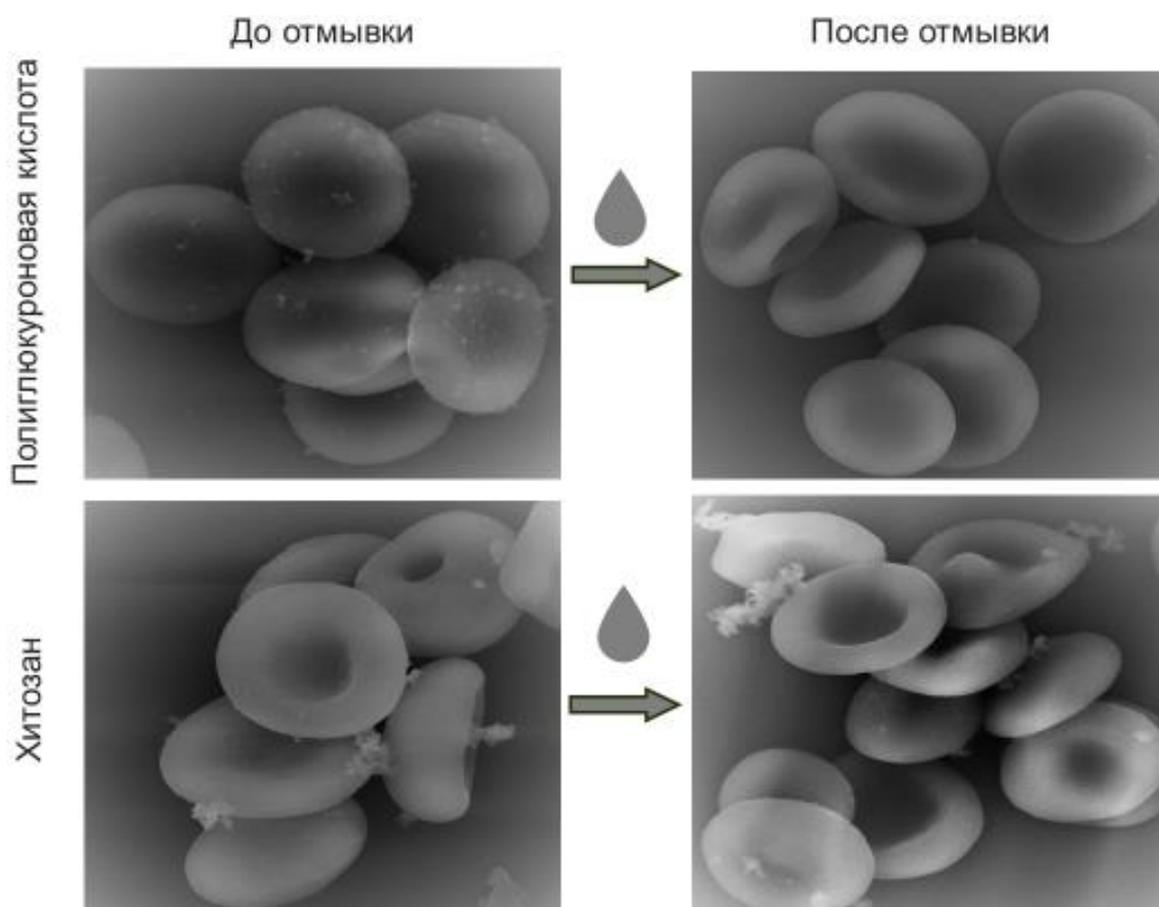


Рис. 18. Зависимость стабильности комплексов эритроцитов с наночастицами от типа поверхности НЧ. Для частиц покрытых полиглюкуроновой кислотой наблюдается десорбция НЧ после отмывки, для частиц покрытых хитозаном наблюдается кластеризация.

Можно было видеть, что наночастицы, покрытые полиглюкуроновой кислотой, связываются единичными частицами и после 1 отмывки почти полностью десорбируются с поверхности, в то же время покрытые хитозаном частицы кластеризуются и кластеры визуально сохраняются при отмывках (Рис. 18). Для обоих типов непокрытых частиц также наблюдалось формирование ими агрегатов на поверхности клеток (Рис. 19).

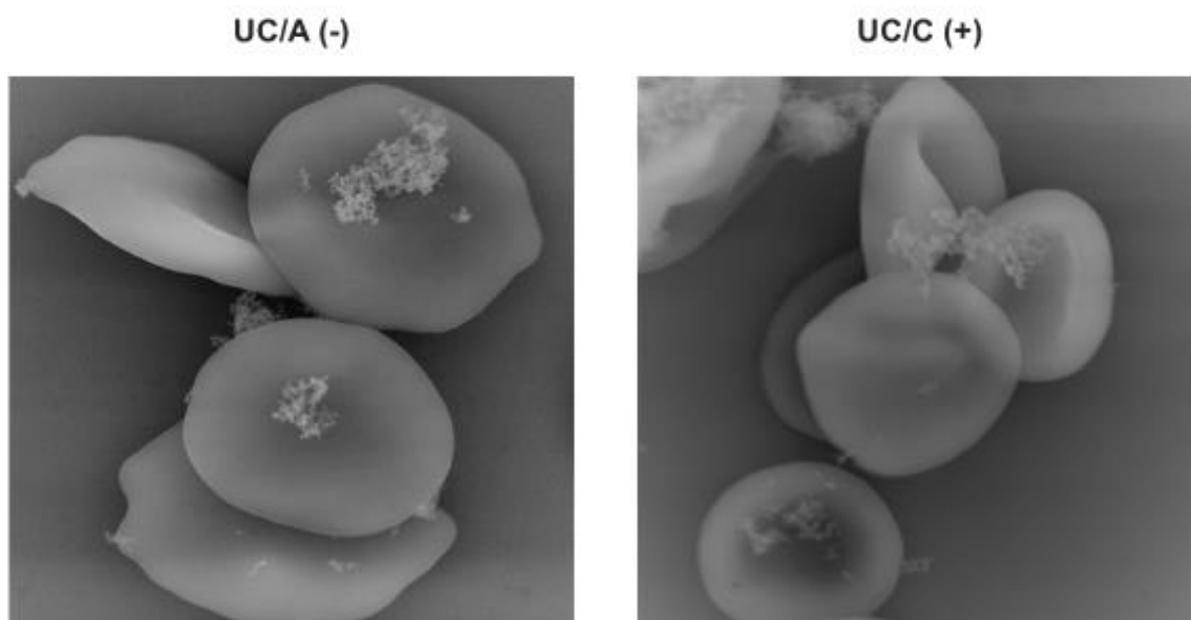


Рис. 19. Комплексы эритроцитов с агрегатами непокрытых частиц с различными зарядами: *слева* – комплексы эритроцитов с непокрытыми отрицательно заряженными частицами (UC/A), *справа* – комплексы эритроцитов с непокрытыми положительно заряженными частицами (UC/C).

#### 4.4. Изучение циркуляции комплексов эритроцит-НЧ

Далее для выбранных наночастиц нами были изучены их циркуляция и биораспределение на мышах линии Balb/c. Для изучения циркуляции в работе был использован описанный выше метод МРQ, позволяющий с высокой чувствительностью и высоким разрешением по времени неинвазивно детектировать магнитные частицы в организме животного.

С использованием МРQ-метода было показано, что лучшее продление циркуляции обеспечивают частицы, которые связываются и не десорбируются с поверхностью частиц (Рис. 20).

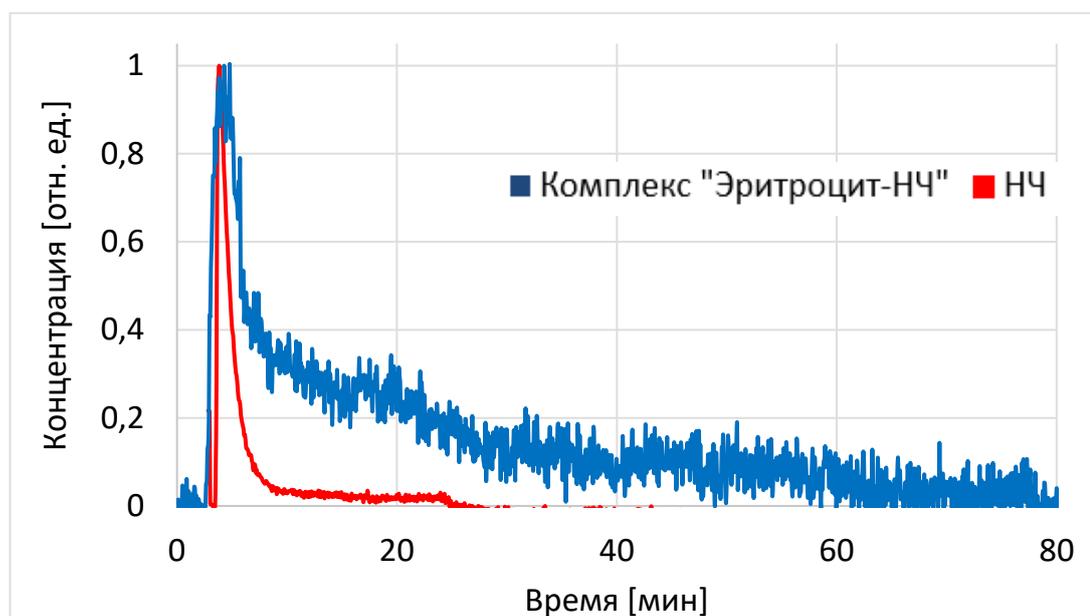


Рис. 20. Зависимости концентрации циркулирующих в крови НЧ, покрытых хитозаном, от времени для комплексов эритроцит-НЧ и свободных наночастиц

Быстро десорбирующиеся наночастицы, покрытые полиглюкуроновой кислотой (ARA), при связывании с эритроцитами практически не меняли своих параметров циркуляции (Рис. 21).

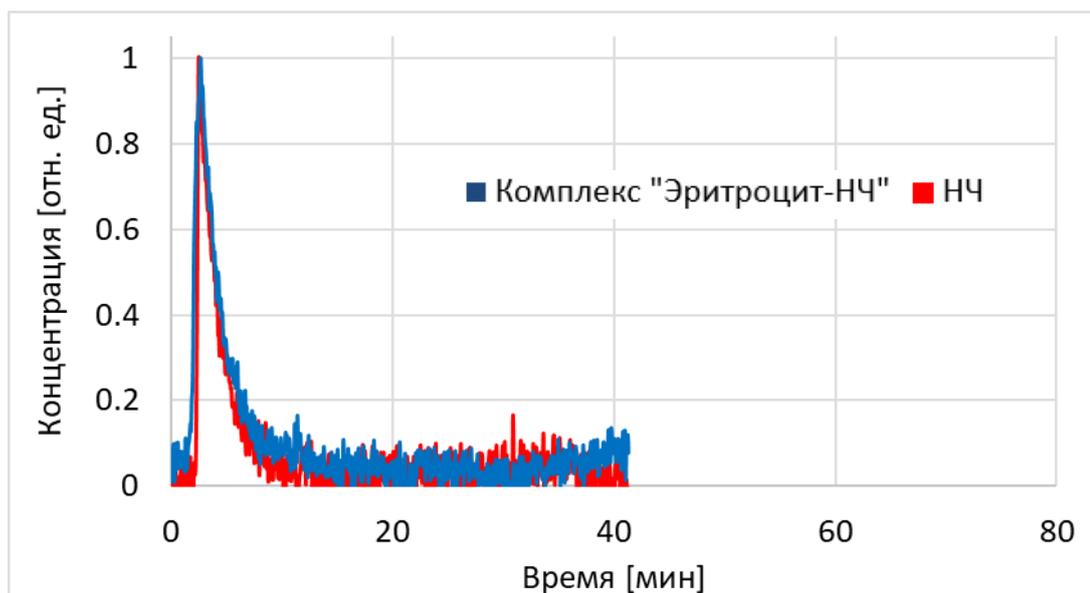


Рис. 21. Зависимости концентрации циркулирующих в крови НЧ, покрытых глюконовой кислотой (ARA), от времени для комплексов эритроцит-НЧ и свободных наночастиц

В качестве контрольной группы выступали свободные наночастицы, в той же дозе, введенные без связывания с эритроцитами (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**). В качестве анализа эффективности циркуляции

нами был выбран параметр времени полувыведения, который часто используется в подобных исследованиях. Можно видеть, что продление циркуляции прямо коррелировало с крепкостью связывания частиц с поверхностью клеток. Для покрытых хитозаном частиц (Chitosan), образующих стабильные комплексы наблюдалось значительное продление времени циркуляции, в то время как для частиц покрытых глюкуроновой кислотой (ARA) какого-либо продления не наблюдалось (Рис. 22).

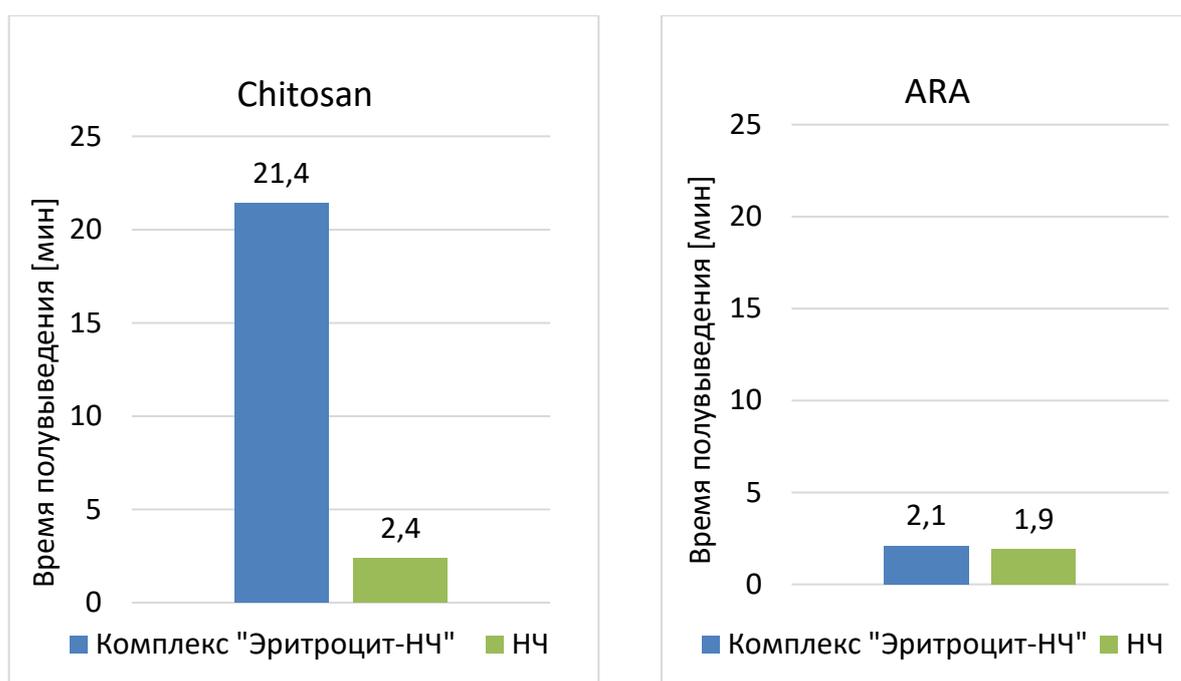


Рис. 22. Зависимость времени циркуляции наночастиц от их связывания с поверхностью эритроцитов для образующих стабильные комплексы хитозановых НЧ (слева) и быстро десорбирующихся НЧ покрытых глюкуроновой кислотой (справа).

При этом интересно, что в случае долгоциркулирующих частиц – кривая их выведения перестает быть моноэкспоненциальной, то есть большая часть 100-нм частиц выводится крайне быстро, и затем выведение резко замедляется (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Такой эффект объясняется тем, что связывание с эритроцитами может продлевать время циркуляции частиц только при их редкой локализации или локализации их на труднодоступных для распознавания макрофагами областях (например, во внутренней ложбине эритроцита)

#### 4.5. Исследование биораспределения наночастиц

Продление циркуляции может приводить к перераспределению частиц между органами и тканями организма. Исходно было предположено проверить как меняется

перераспределение частиц для наших частиц, которые по-разному продлевали свою циркуляцию. Для этого MPQ методом производилось измерение интегрального количества частиц в каждом органе. Оказалось, что для покрытых частиц, в случае их связывания с эритроцитами не наблюдались изменения распределения при использовании ARA частиц, но в случае частиц покрытых хитозаном видим существенное уменьшение их поглощения в печени и селезенке и 10-кратный рост локализации в легочной ткани через 2 часа после введения (Рис. 23).

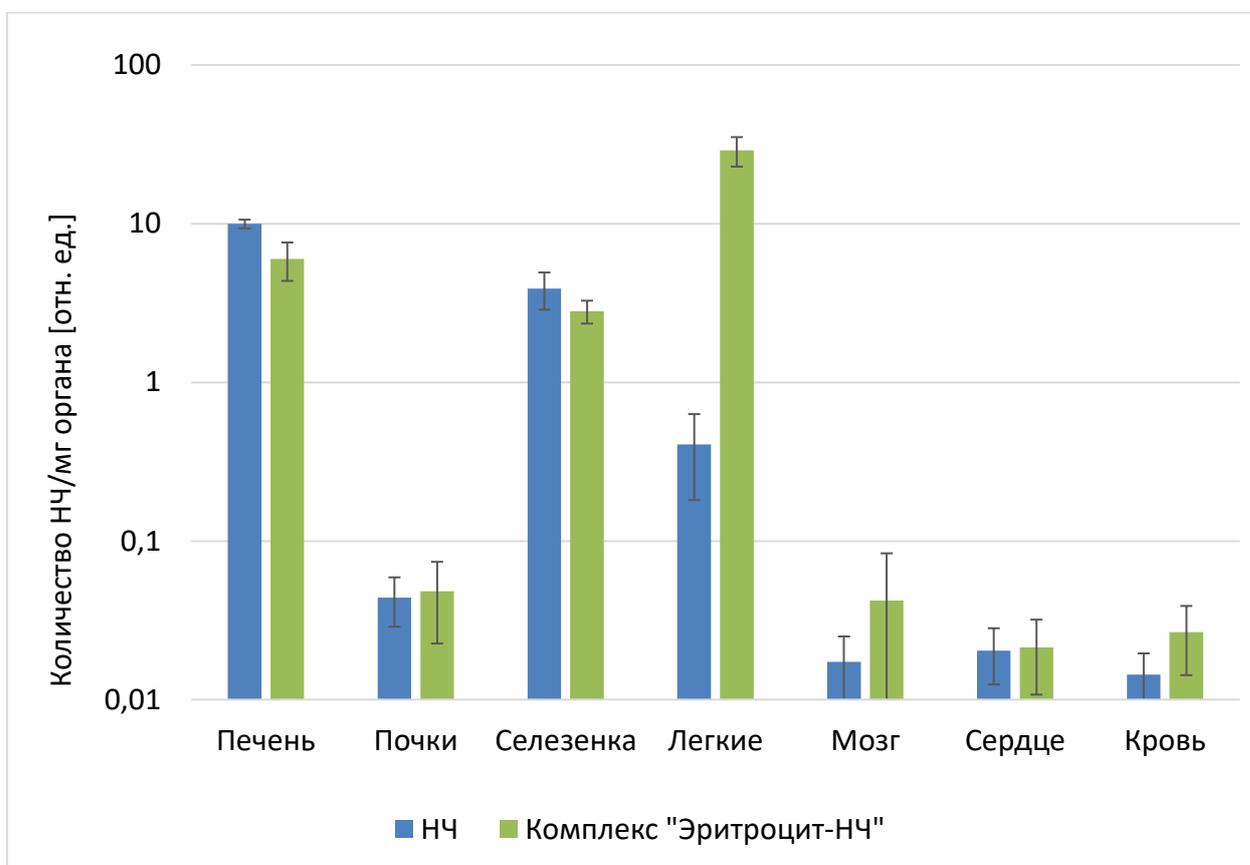


Рис. 23. Зависимость биораспределения покрытых хитозаном наночастиц по органам мыши от их связывания с поверхностью эритроцитов.

В то же время было обнаружено, что в случае использования непокрытых частиц, их локализация в легких также увеличивалась существенно. Причем для UC/A частиц, которые не увеличивали свою циркуляцию локализация в легких увеличивалась на 2 порядка (Рис. 24).

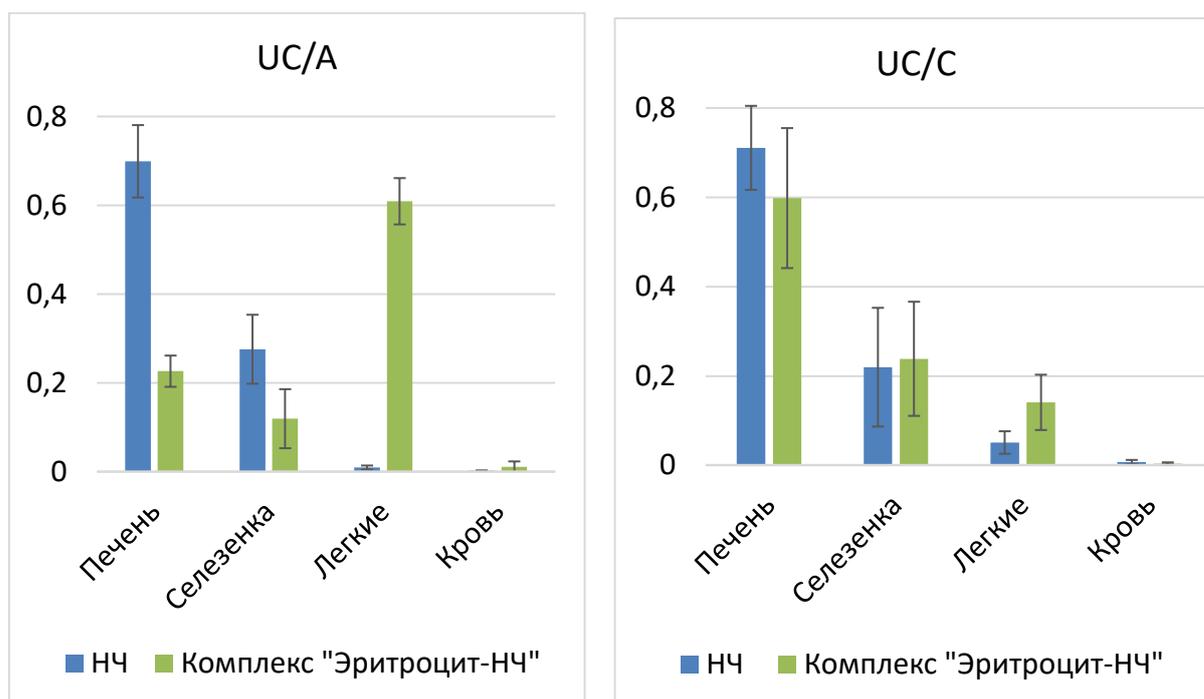


Рис. 24. Биораспределение отрицательно- (UC/A) и положительно- (UC/C) заряженных непокрытых наночастиц.

Изменения биораспределения для UC/A частиц поражает тем, что их полное выведение из кровотока в случае образования комплексов с эритроцитами, занимает всего 7 минут. Это означает, что они напрямую поглощаются в легких в течение первых нескольких проходов по кругам кровообращения, избегая поглощения в печени. Это противоречит предыдущей существующей доктрине, постулирующей, что высокое поглощение в легких является следствием их длительной циркуляции и последовательного накопления в тканях легких.

В нашем случае мы полагаем, что при повторных проходах комплексов сквозь альвеолярные капилляры возможно частичное снятие крупных агрегатов, что происходит гораздо легче, чем в случае одиночных частиц, т.к. взаимодействие между частицами может быть гораздо меньше, чем между разнозаряженными частицей и клеткой.

Наблюдаемые изменения накопления частиц в легких могут быть использованы для различных применений, например для доставки генов и токсинов с целью осуществления лечения социально-значимых заболеваний легких, таких как легочный фиброз или раковые новообразования. В качестве предварительного применения в работе была проверена возможность использования данного метода для предотвращения развития метастаз в тканях

легких

(

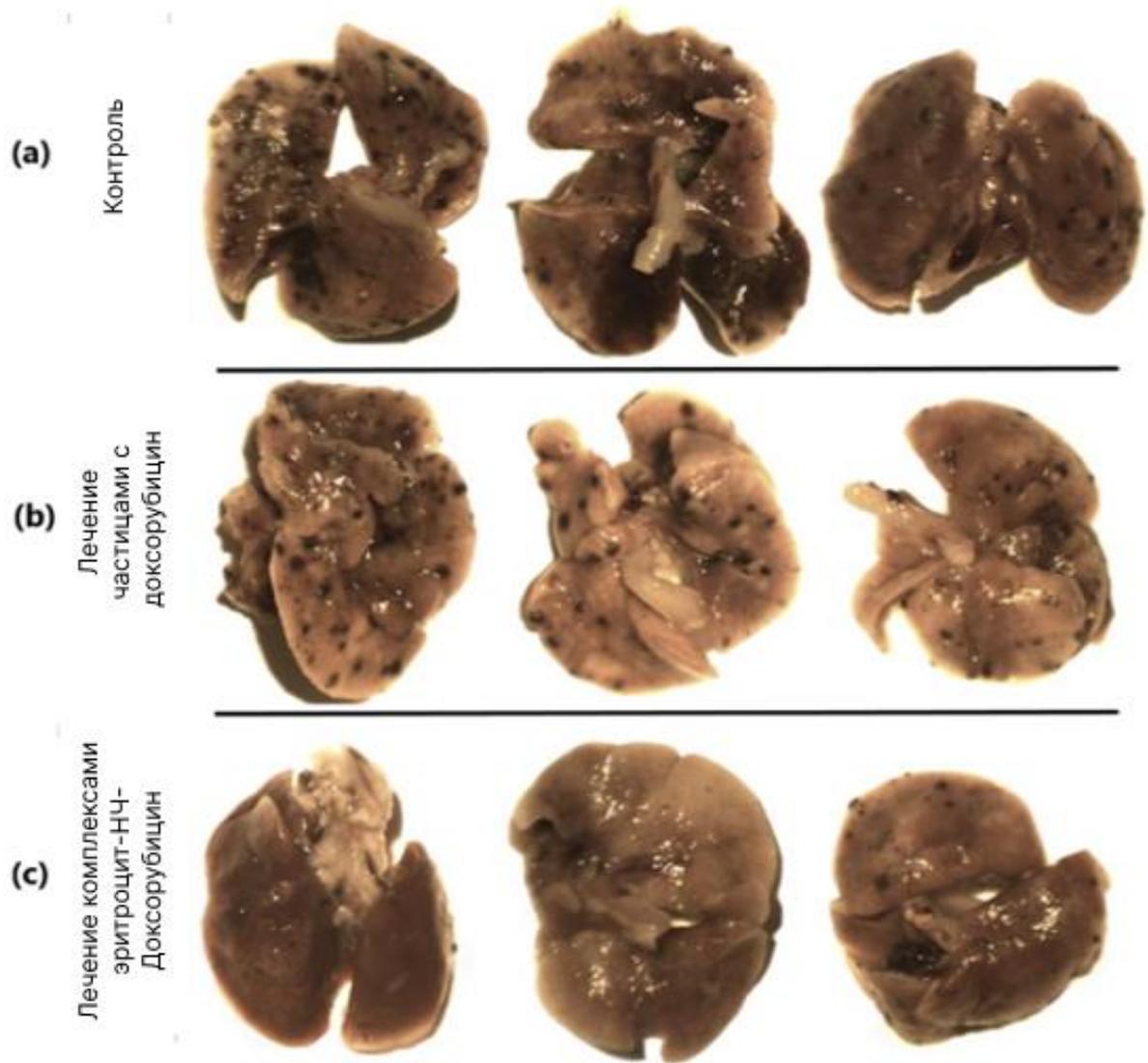


Рис. 25).

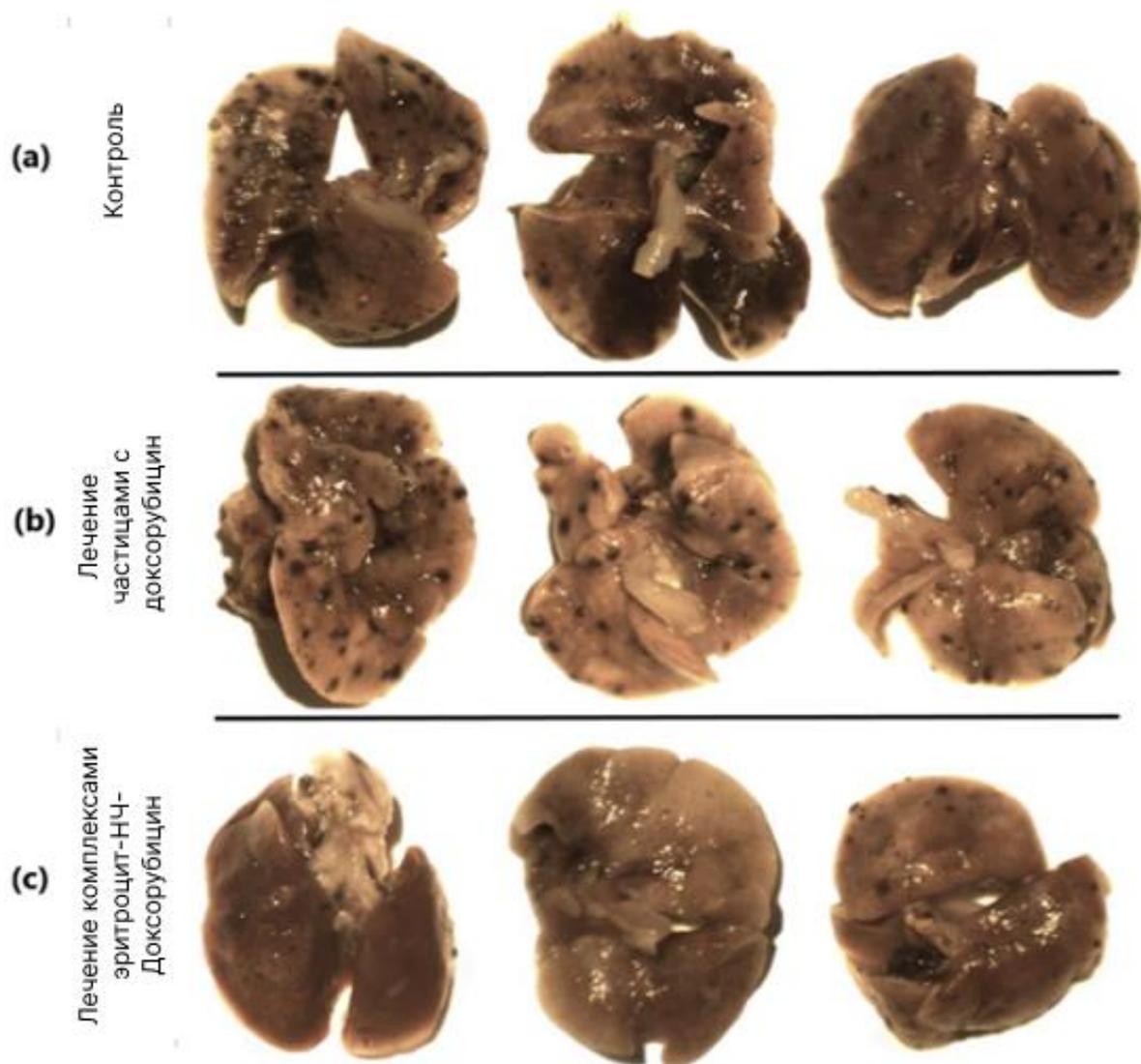


Рис. 25. Лечение онкообразований в легких: (а) – контрольная группа, наблюдаются множественные онкообразования; (б) – группа, прошедшая курс лечения наночастицами инкубированными в доxorубицине, отличий от контрольной группы не наблюдается; (с) – группа, прошедшая курс лечения комплексами эритроцит-НЧ, проинкубированными в доxorубицине, наблюдаются единичные онкообразования.

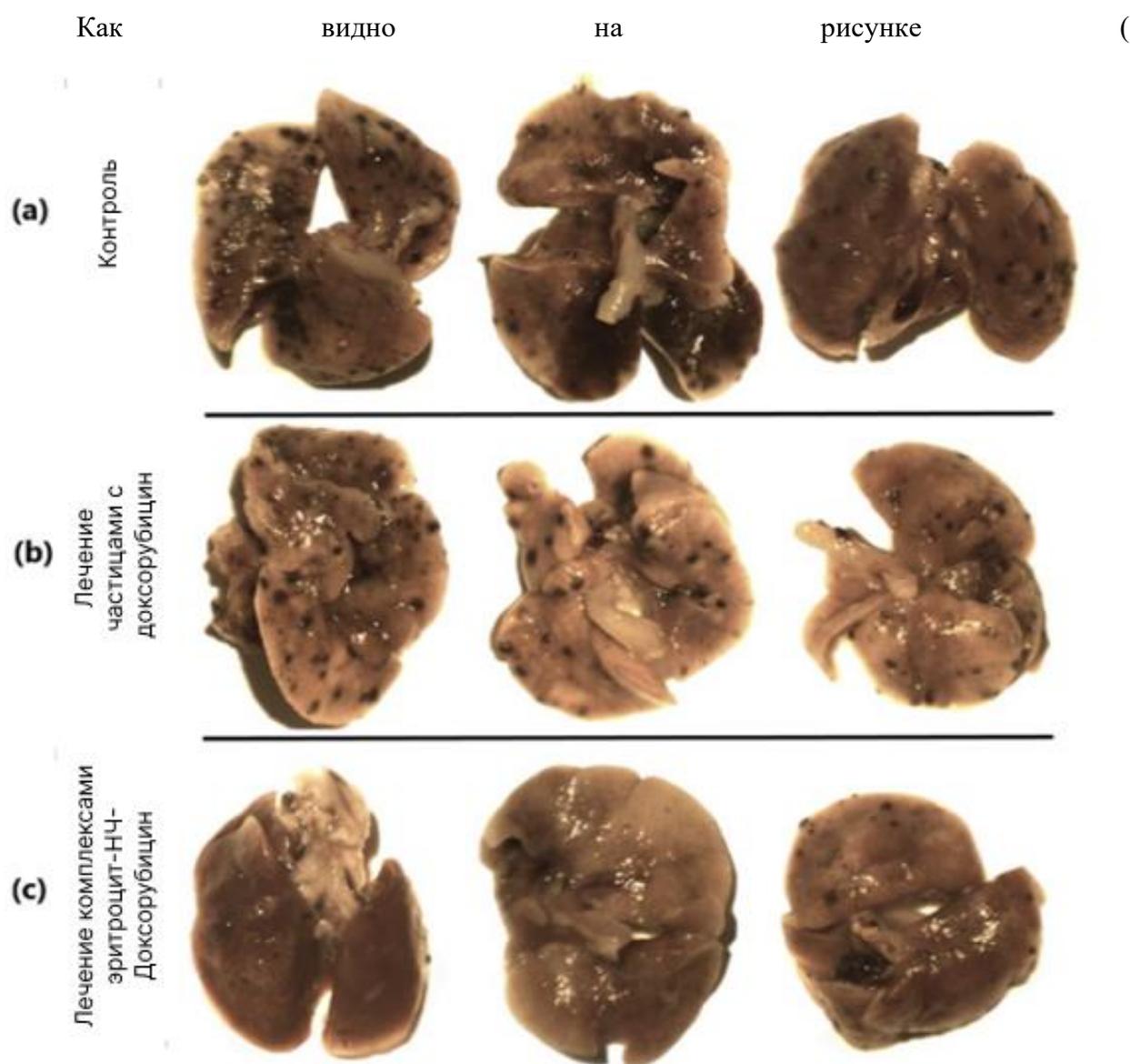


Рис. 25), лечение с применением описанного метода приводило к уменьшению как количества наблюдаемых метастаз на 9 день наблюдения, так и к уменьшению среднего размера опухолевого узла. При этом никаких изменений по сравнению с контролем (без лечения) не наблюдалось при осуществлении лечения свободными наночастицами, проинкубированными с доксорубицином.

#### 4.6. Изучение биодegradации наночастиц

В данном разделе был предложен принципиально новый подход изучения метаболизма магнитных наночастиц, основанный на MPQ технологии (Magnetic Particle Quantification) [145]. Данный метод является количественным в диапазоне 7 порядков концентраций, который позволяет анализировать малые количества магнитного материала

до нескольких нг вещества, а также разделять сигнал от суперпарамагнитных частиц и диа- и парамагнитного окружения. В данной работе нами была создана модификация метода для неинвазивного и высокочувствительно анализа концентрации частиц в печени животного. Разработанный метод в серии *in vitro* и *in vivo* тестов показывал высокую корреляцию степени деградации частиц с классическими подходами MRI, масс-спектрометрии и спектрофотометрии.

Данный подход позволил провести годовое сравнительное исследование динамик метаболизма нескольких десятков типов магнитных наночастиц в организме мышей. Были определены фундаментальные зависимости скорости биотрансформации магнитного материала от гидродинамического размера частиц, их внутренней структуры и природы внешнего полимерного покрытия, а также установлено количественное влияние дозы вводимого наноагента на скорость его деградации в печени мыши. Полученные данные открывают новые подходы к управлению метаболизмом частиц в организме, что важно для создания наноагентов с низкой токсичностью для диагностики и терапии заболеваний.

#### **4.6.1. Измерение количества НЧ в печени с помощью MPQ метода**

Для исследования биodeградации магнитных наночастиц в этом исследовании использовался новый метод, основанный на методе MPQ [145]. Ранее MPQ метод успешно применялся для магнитных иммуноанализов *in vitro* для обнаружения антигенов, связанных с магнитными наночастицами в реакционном объеме [146], и для исследований *in vivo* циркуляции магнитных наночастиц в кровотоке и изучения их биораспределения по органам [99]. Кратко, магнитная катушка возбуждает частицы полем на двух частотах – с высокой амплитудой  $H_1 = 47.7$  Ое и низкой частотой  $f_1 = 156$  Hz и низкой амплитудой  $H_2 = 10.3$  Ое и высокой частотой  $f_2 = 156$  kHz. L-невредные магнитные материалы, включая ионы железа и белок ферритина [99] дают отклик только на приложенных частотах поля, в то время как нелинейные магнитные материалы дают отклик на комбинаторных частотах поля  $f_2 + mf_1$ , где  $m$  – целое число (Рис. 26а). MPQ сигнал от магнитных частиц пропорционален произведению их магнетизации и коэффициента нелинейности петли гистерезиса. Поэтому постепенная биотрансформация материала частиц из суперпарамагнетика в биогенные формы должна сопровождаться падением MPQ сигнала до нуля, что позволяет использовать метод для оценки времени жизни частиц в организме.

Для неинвазивной регистрации деградации частиц использовался прибор с широкой внешней измерительной катушкой (Ø 20-мм). Для измерения концентрации частиц мыш

фиксируют в руке и сканировали катушкой область печени животного (Рис. 26а). При этом мы детектировали магнитный сигнал только от частиц вблизи поверхности катушки. Магнитные измерения показали, что сигнал от частиц у поверхности катушки был лишь на 1 порядок меньше сигнала от такого же количества частиц внутри катушки (Рис. 26б, центральный график). Учитывая 7-Log линейный диапазон прибора, он все еще обладал высокой чувствительностью, достаточной для оценки деградации. *In vitro* измерения с использованием 50-nm FluidMAG-ARA частиц показали, что предел детекции на высоте 5 мм от катушки составлял 0.9 мкг магнитных частиц, а у поверхности – 132 нг. В планарной области катушки чувствительность детекции изменялась не более чем на 5 процентов (Рис. 26б, правый график).

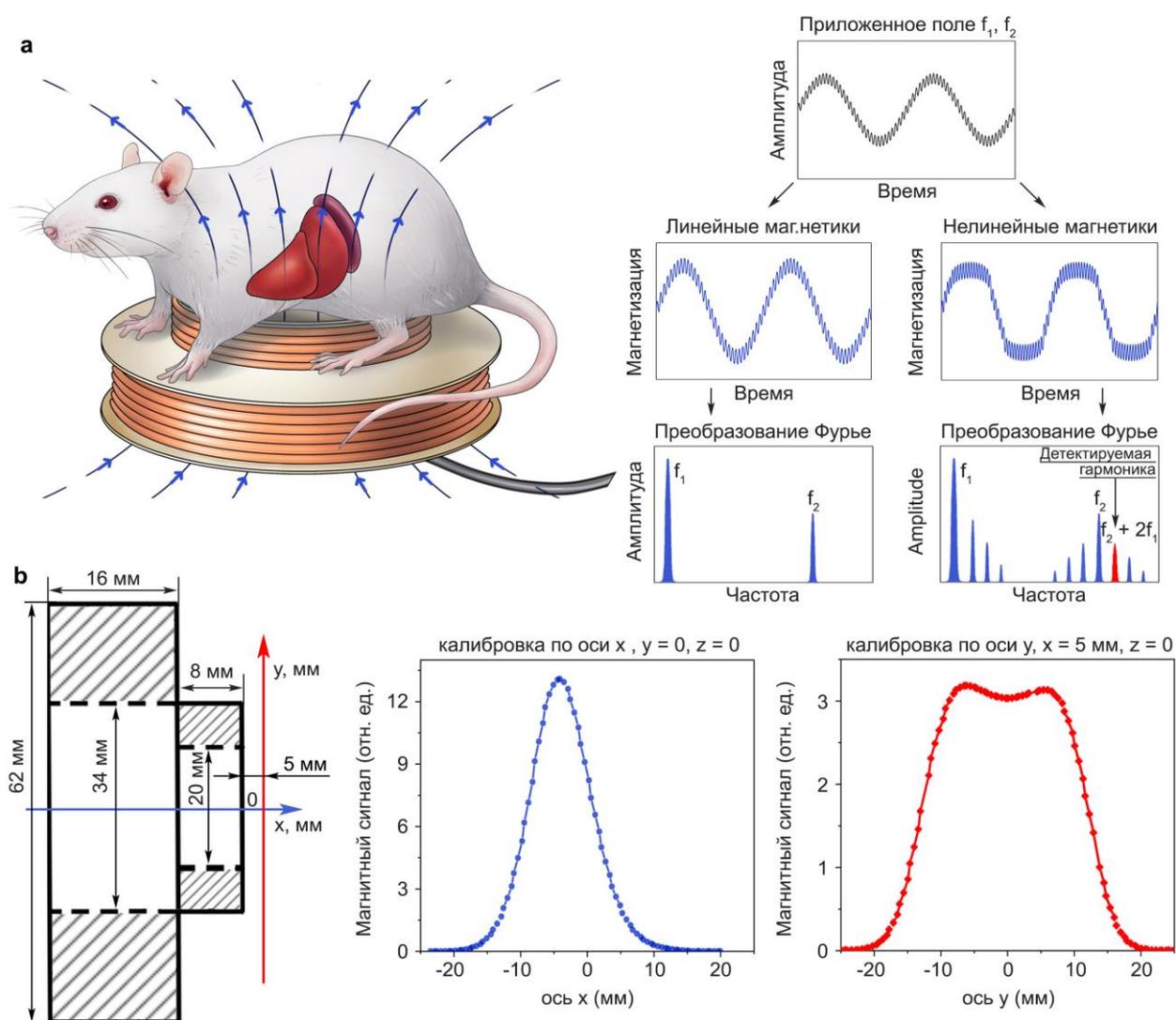


Рис. 26. MRQ метод для изучения деградации магнитных частиц: (а) Схема эксперимента для проведения MRQ измерений. Магнитный сигнал от частиц неинвазивно измеряется магнитной катушкой в области печени мыши. Биогенные формы железа детектируются только на частотах  $f_1$ ,  $f_2$  генерируемых катушкой, в то время как суперпарамагнитные наночастицы – также на

комбинаторных гармониках. (b) Схема измерительной катушки и измерение ее чувствительности по осям x и y (ввиду круговой симметрии катушки ось z аналогична оси y)

#### 4.6.2. Анализ деградации МЧ *in vitro*

Чтобы показать, что измерения MPQ могут правильно отражать изменения в магнитных наночастицах во время их биотрансформации, метод *in vitro* сравнили со стандартными методами количественной оценки железа: спектрофотометрией, основанной на реакции Перлса [147] и масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой [148].

В качестве модельных наночастиц были синтезированы частицы магнетита с размером ядра  $10.8 \pm 2.9$  нм (Рис. 27) с последующим покрытием цитрат анионом. Данные частицы имели кристаллическую структуру, соответствующую магнетиту (Рис. 28), гидродинамический размер  $37 \pm 17$  нм и  $\zeta$ -potential  $-50.7 \pm 20$  mV, обеспечивающий им высокую коллоидную стабильность в PBS буфере (Рис. 29).

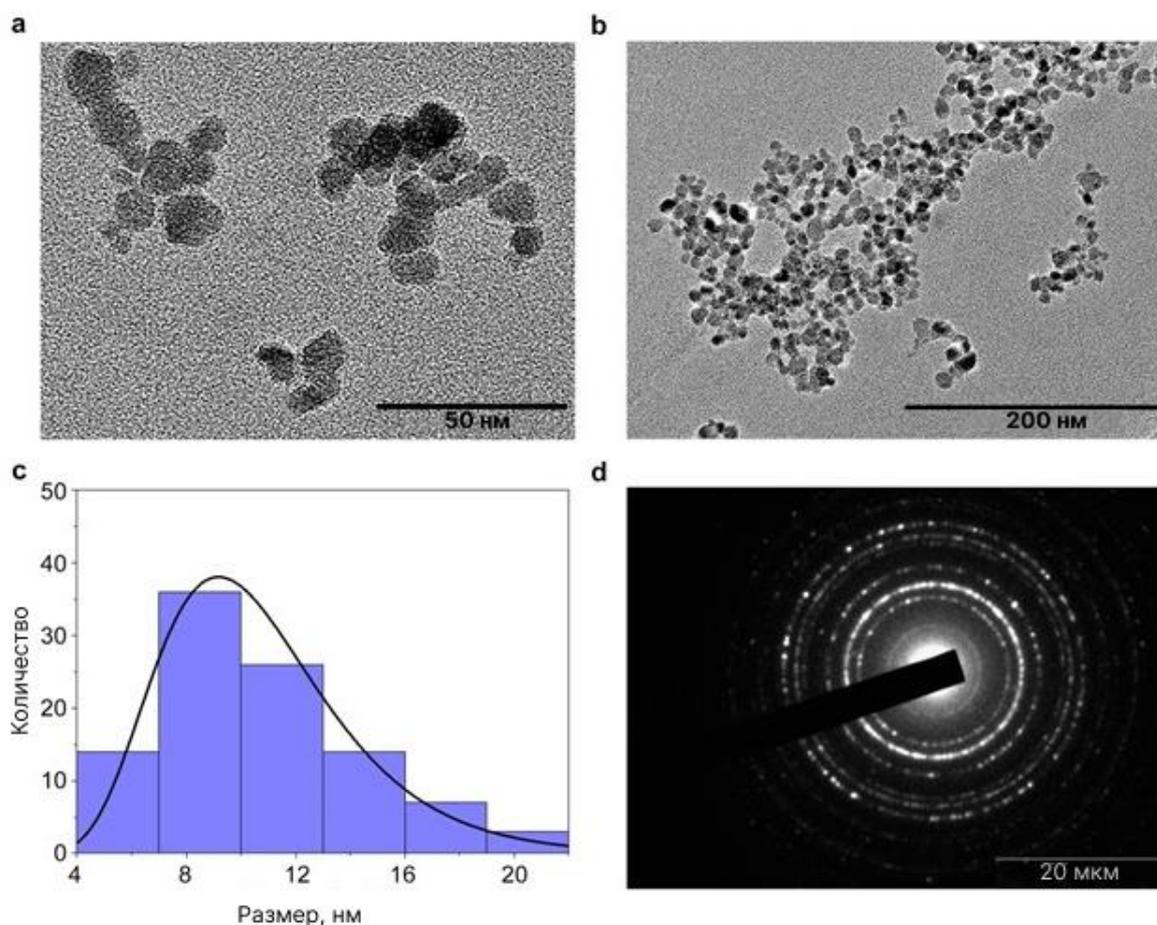


Рис. 27. Характеристика наночастиц магнетита (a, b) Изображения просвечивающей электронной микроскопии. c) Распределение по размерам,  $n = 100$ . Черная линия показывает логнормальное распределение. d) Электронная дифракционная картина от наночастиц, показывающая, что ядра

имеют пространственную группу Fd-3m (кубическую систему), межпланарные расстояния наиболее интенсивных линий в кристалле составляют 0,49, 0,29, 0,25, 0,21, 0,17 и 0,15 нм.

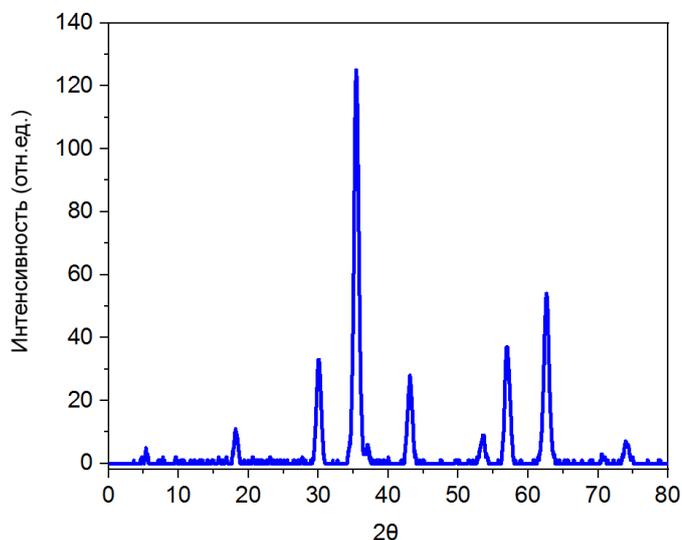


Рис. 28. Рентгеновская дифракционная картина синтезированных наночастиц магнетита. Cu K $\alpha$  источник излучения ( $\lambda = 1.54182 \text{ \AA}$ ).

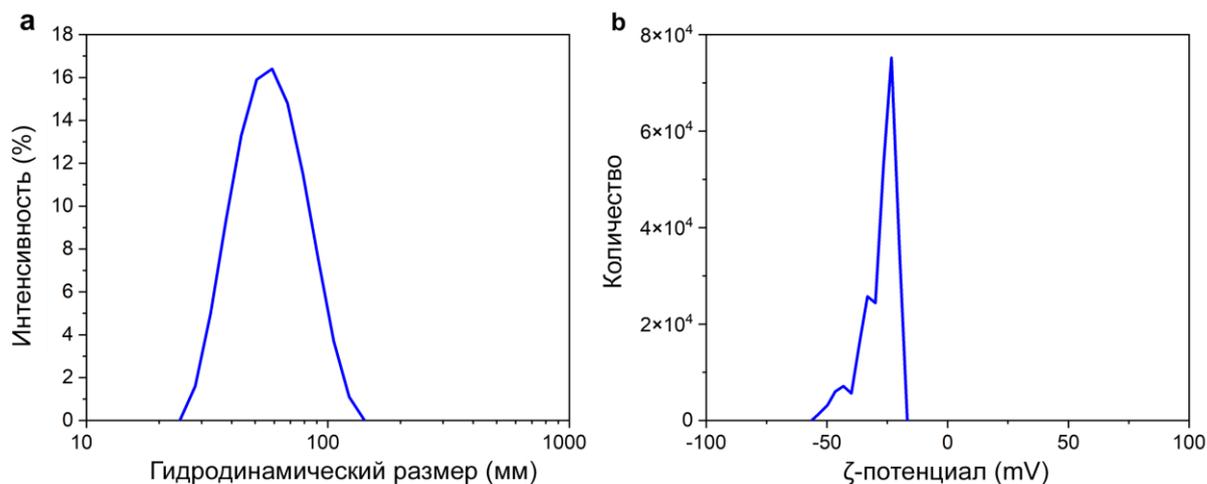


Рис. 29. Характеризация синтезированных наночастиц магнетита с цитратным покрытием. (a) Распределение по гидродинамическому размеру (b) и распределение по  $\zeta$ -потенциалу.

Для изучения деградации частиц они инкубировались в концентрации 10 мкг/мл в цитратных буферах, с различным рН, в том числе имитирующим условия лизосом, рН 4.8 (Рис. 30а). Буферы с использованием цитратных хелатирующих агентов часто используются для оценки внутриклеточного метаболизма ионов железа [149,150].

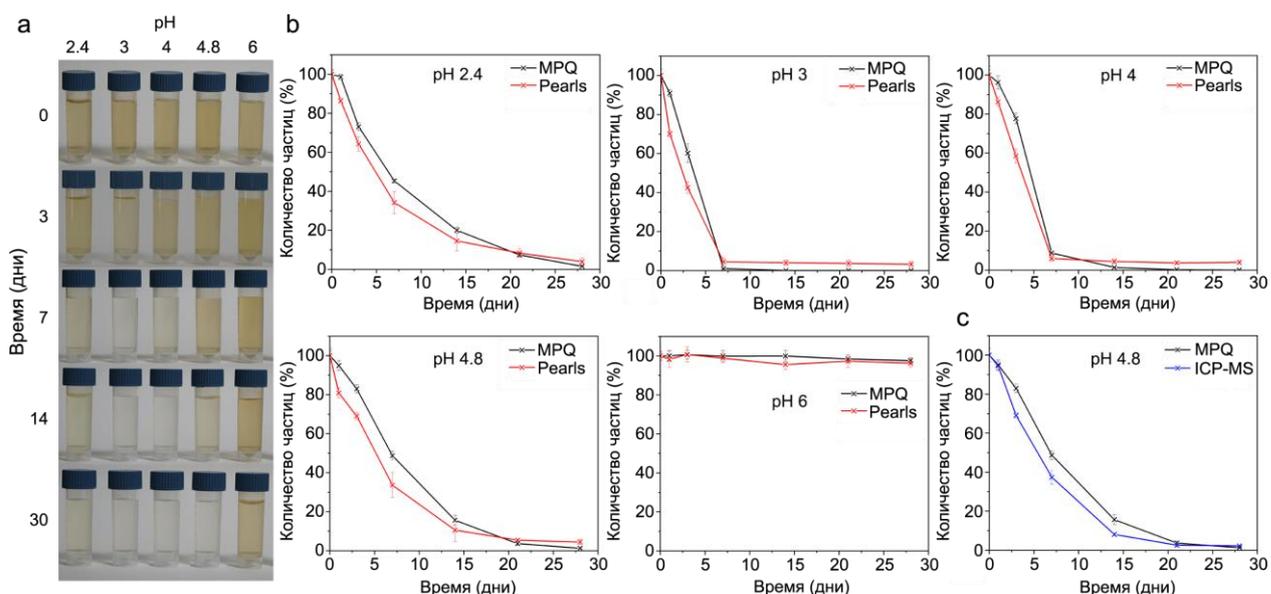


Рис. 30. Деградикация наночастиц *in vitro*: Изучение степени деградации магнитных частиц в 0.1 М цитратных буферах в течение месяца в зависимости от pH среды: (а) визуальное наблюдение деградации частиц в пробирках (b,c) количественное измерение степени разложения частиц путем MPQ измерения (black dots), спектрофотометрического окрашивания по Перлсу (b, red dots) и масс-спектрометрического анализа (c, blue dots). (n=3)

Динамика деградации частиц в буферах показала высокую корреляцию методов MPQ и спектрофотометрии при окраске по Перлсу (коэффициент корреляции Пирсона 0.987, Рис. 31а).

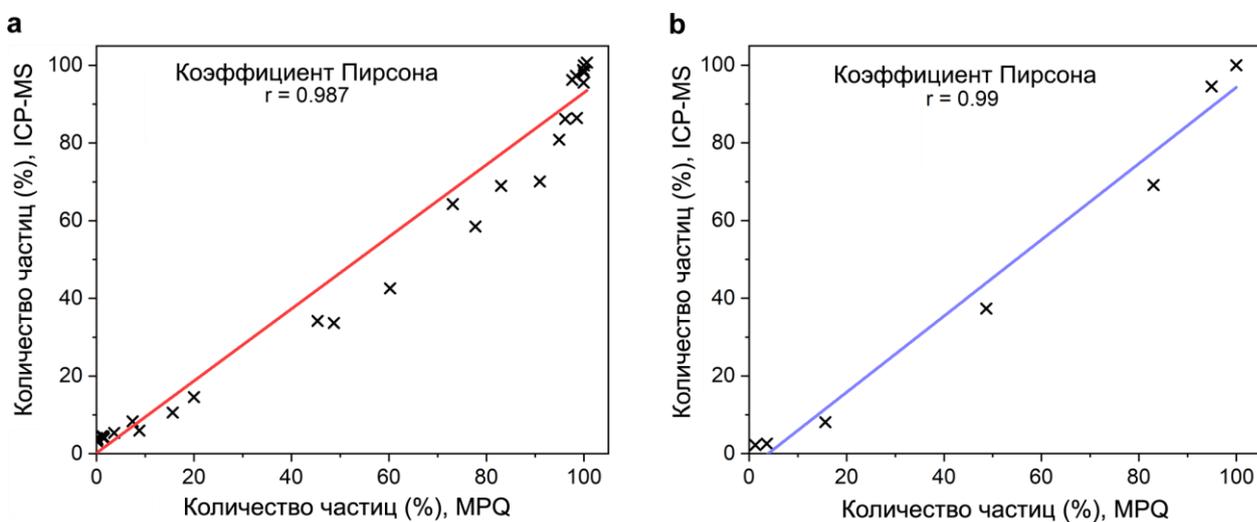


Рис. 31. Верификация MPQ метода. Корреляционный анализ Пирсона количества синтезированных наночастиц магнетита с цитратным покрытием, измеренных (а) методом окраски по Перлсу и MPQ прибором; (b) масс-спектрометром и MPQ прибором. Линии показывают линейную аппроксимацию данных.

Для обоих методов наблюдалось слабая менее 5% деградикация частиц за месяц при pH 6 (Рис. 30b). Активная деградикация наблюдалась при понижении pH, достигающая максимума при pH 3. Деградикация частиц в условиях лизосом (pH 4.8) была также измерена методом масс-спектрометрии (Рис. 30c). Мы также наблюдали корреляцию MPQ метода с

масс-спектрометрией, коэффициент корреляции Пирсона 0.99 (Рис. 31b). MPQ сигнал менялся пропорционально количеству железа в них, что подразумевает отсутствие перехода магнетита в парамагнитную фазу в ходе метаболизма в цитратных буферах. Это позволяет использовать MPQ метод для оценки старения магнитных наночастиц в процессе их деградации.

Затем была изучена деградация *in vitro* более крупных частиц, которые использовались далее в этой работе. 100-нм наночастицы FluidMAG-CMX, 220-нм пористые наночастицы Estapor и 1-мкм частицы Spherotech с карбоксильным покрытием инкубировали в цитратном буфере, pH 4,5 в течение 1 месяца. Количественная оценка железа проводилась с использованием ICP-MS. Результаты (Рис. 32) показывают, что MPQ метод правильно описывает скорость деградации оксидов железа даже для крупных частиц и, следовательно, может быть использован для оценки продолжительности жизни различных магнитных частиц.

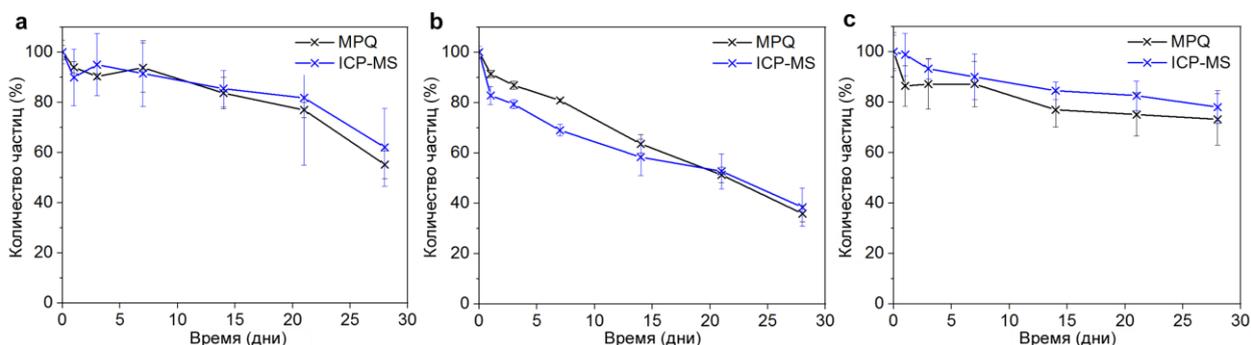


Рис. 32. Деградация магнитных частиц *in vitro* в цитратном буфере 0,1М, pH=4,8; результаты количественной оценки степени разложения частиц с помощью MPQ метода (черные точки) и масс-спектрометрического анализа (синие точки). Использовались следующие частицы: (a) 100-нм FluidMAG-CMX, (b) 200-нм пористый Estapor, (c) 1-мкм Spherotech с карбоксильным покрытием; n = 3 образца для каждой кривой.

#### 4.6.3. Изучение деградации магнитных наночастиц *in vivo*

Известно [151] что наночастицы выводятся из кровотока клетками мононуклеарной фагоцитарной системы (MPS), например, клетками Купфера печени, остаточными макрофагами селезенки, макрофагами альвеол легких и т.д. Печень и селезенка являются основными органами для поглощения неспецифических наночастиц, что обусловлено большим присутствием в них фагоцитов, активным кровоснабжением (до 25% сердечного выброса для печени) и повышенной поглощенной активностью их макрофагов по сравнению с другими клетками [152,153].

Исследование биораспределения наночастиц магнетита с цитратным покрытием проводили с помощью методов МРQ и МРТ. Согласно нашим измерениям МРQ, 93% введенной дозы (ID) наночастиц были обнаружены в печени и в 15 раз меньше – в селезенке (Рис. 33а). Исследование МРТ качественно подтвердило это наблюдение (Рис. 33б). Наночастицы оксида железа действовали как отрицательный контраст для МРТ, поэтому более темный цвет соответствует более высокой концентрации частиц. Значительные контрастные изменения наблюдались в селезенке и печени через 2 ч после инъекции наночастиц, в то время как контраст других крупных органов и тканей оставался практически постоянным. Согласно данным МРQ, в других органах накапливалось менее 2% введенной дозы частиц. Кроме того, большинство частиц, показали аналогичную картину биораспределения: 85-98% поглощения ID в печени и 2-6% накопления ID в селезенке [99]. Таким образом, печень и селезенка играют ключевую роль в метаболическом разрушении МЧ, поэтому дальнейший анализ был сфокусирован в биодegradации наночастиц на этих органах.

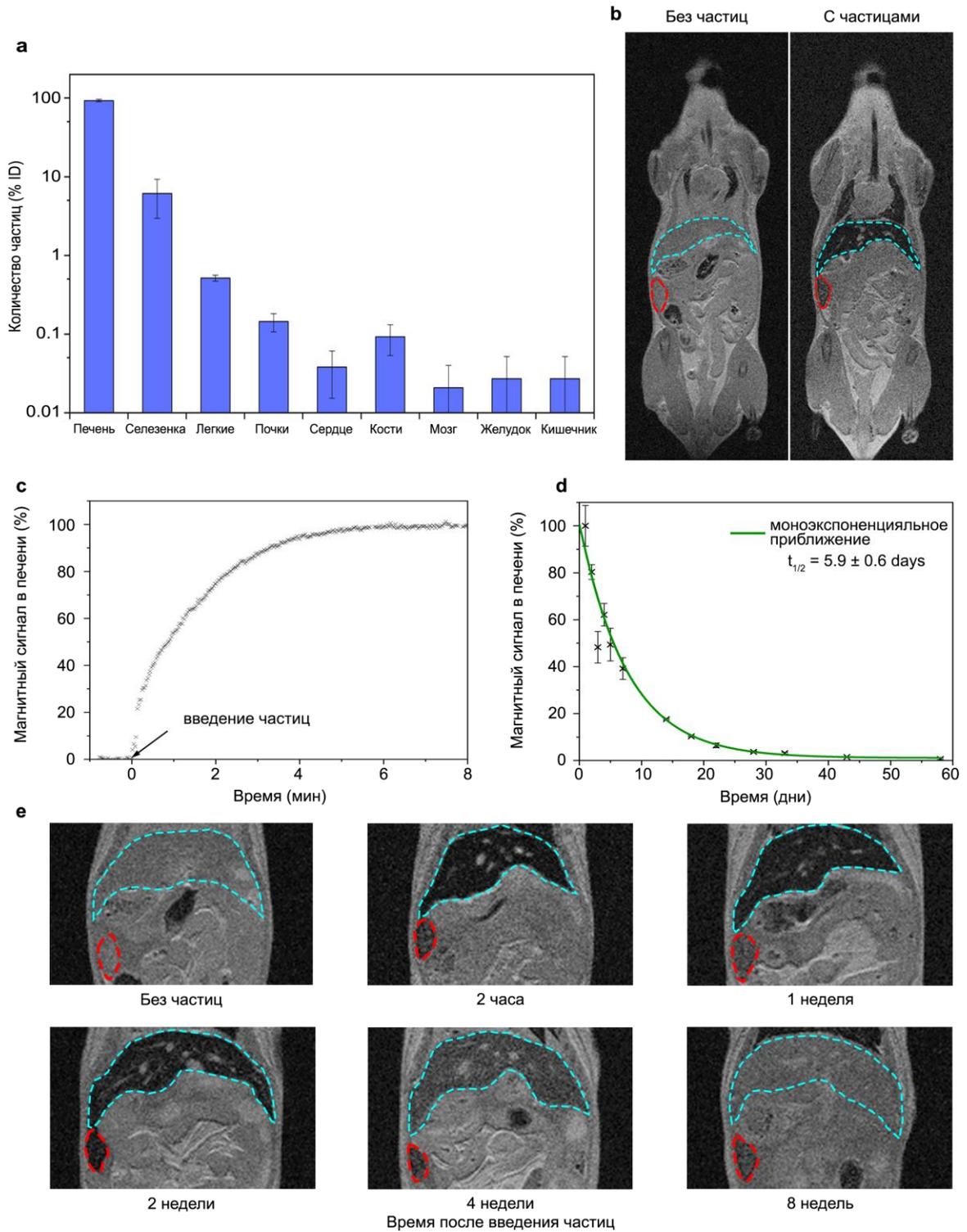


Рис. 33. Исследование биодеградации наночастиц *in vivo*: (a, b) Результаты МРQ (a) и МРТ (b) измерения биораспределения наночастиц магнетита с цитратным покрытием. Голубые и красные линии указывают на расположение печени и селезенки, соответственно,  $n = 3$  мышей; (c, d) МРQ данные репрезентативной кинетики накопления (c) и деградации (d) в печени 100 мкг стабилизированных цитратом МЧ,  $n = 3$  мыши; (e) Репрезентативные данные МРТ 2-месячных исследований эволюции 100 мкг цитрат-стабилизированных МЧ в печени и селезенке. Голубые и красные линии указывают на расположение печени и селезенки, соответственно,  $n = 3$  мыши на каждую временную точку.

Затем в работе изучили возможность неинвазивного анализа накопления частиц в печени и их деградации с помощью МРQ. Для изучения кинетики накопления частиц в печени мыши, животное анестезировалось, после чего фиксировалась на столике с встроенной в его дно детектирующей катушкой. Центр катушки располагался под областью печени животного и цитрат-покрытые наночастицы магнетита вводились внутривенно. В результате мы наблюдали в реальном времени рост сигнала от магнитных частиц (Рис. 33с, Рис. 34). Стабилизация количества поглощенных частиц в печени и селезенке наблюдалась в течение первых нескольких минут, что соответствовало времени их полного выведения из кровотока (Рис. 35).

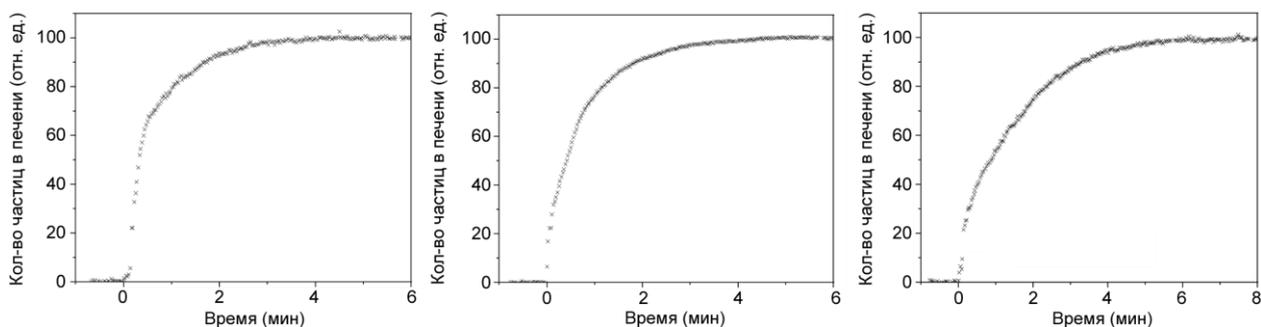


Рис. 34. Кинетики накопления в печени 100 мкг синтезированных наночастиц магнетита с цитратным покрытием,  $n=3$  мышей. Наночастицы вводили в нулевую точку по времени.

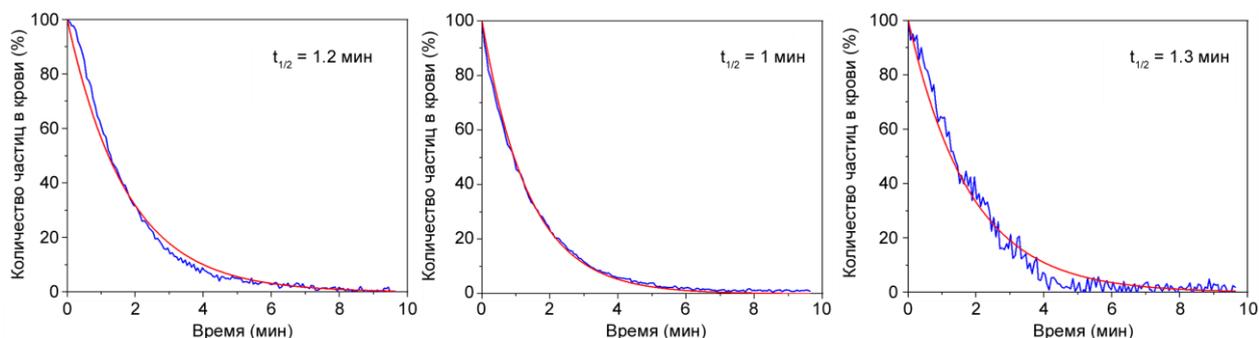


Рис. 35. Кинетики выведения из кровотока наночастиц магнетита с цитратным покрытием. Сплошная красная линия показывает моноэкспоненциальную кривую аппроксимации,  $n = 3$  мыши.

Для измерения деградации частиц анестезию животного не проводили для уменьшения у мышей стресса от инъекций. Мышь фиксировалась в руке и катушкой производилось сканирование области печени животного для поиска максимума сигнала. Одно измерение концентрации частиц занимало не более 10 секунд.

Измеренные МРQ-данные качественно коррелировали с изменением контраста, создаваемого ими при МРТ визуализации (Рис. 33е). При этом наблюдаемая кинетика

деградации может быть приближена с высокой точностью моноэкспоненциальной кривой (Рис. 33d).

Измеренные данные МРQ были качественно коррелированы с изменением контраста МРТ, генерируемого частицами (Рис. 33е). Контраст частиц МРТ в печени постепенно уменьшался со временем и через 8 недель был сопоставим с контрастом мышей без наночастиц (см. сравнения средних сигналов МРТ на Рис. 36). Это подтверждает данные МРQ, где 99% наночастиц, обнаруженных в печени и селезенке, деградировали через 2 месяца после инъекции МР. Интересно, что в селезенке интенсивность контраста МРТ не изменялась монотонно. Через 2 недели сигнал МРТ был ниже, чем через 2 ч после инъекции частицы (Рис. 36), а через 8 недель слабый контраст частиц все еще был различим.

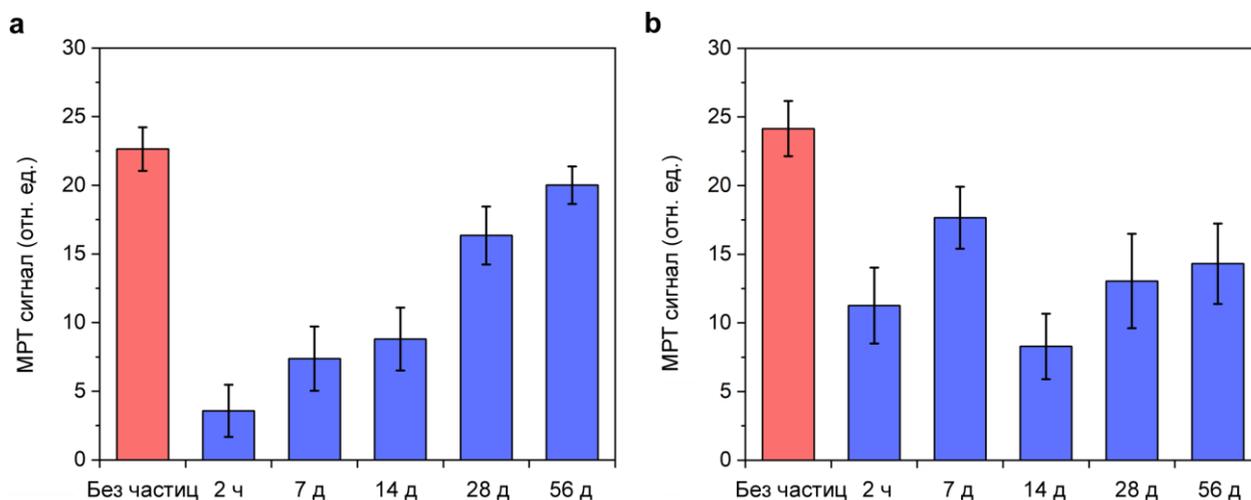


Рис. 36. Средние сигналы МРТ (а) печени и (б) селезенки в различные моменты времени после введения 100 мкг частиц магнетита, покрытых цитратом. Более высокие сигналы МРТ соответствуют меньшим количествам наночастиц в органе,  $n = 3$  мышей.

Чтобы оценить вклад отдельных органов: печени и селезенки в детектируемый сигнал, мы ввели внутривенно мышам 1 мг цитрат-покрытых частиц и дождались их полного выведения из кровотока. Затем, мышь умерщвлялась и производилась спленектомия. Детектируемый катушкой сигнал анализировался до и после удаления селезенки. В итоге селезенка давала  $26 \pm 11$  % от детектируемого сигнала, при том что только  $8 \pm 3$  % частиц аккумулировалось в этом органе (Рис. 37). Это может объясняться анатомически более близким расположением ткани селезенки к поверхности. Стоит отметить, что метаболизм частиц в селезенке может происходить медленнее чем в печени. Этот факт наблюдается на данных МРТ-исследований (Рис. 33), в которых через 8 недель

после введения частиц все еще наблюдалось контрастирование селезенки, в сравнении с мышью без частиц.

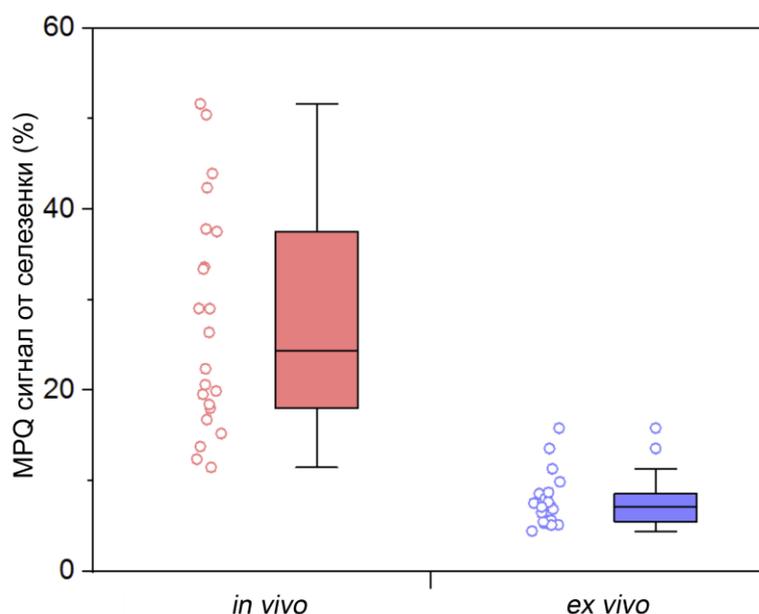


Рис. 37. Сравнение относительного вклада наночастиц из селезенки в общий магнитный MRQ сигнал в неинвазивных (красный) и инвазивных (синий) форматах исследования. В неинвазивном формате сигнал MRQ считывался в области печени и селезенки мышей до и после спленэктомии. В инвазивном формате печень и селезенка были извлечены, а количество частиц измерялось внутри измерительной катушки MRQ. Данные представлены в виде прямоугольных графиков типа Tukey,  $n = 21$  мышь.

#### 4.6.4. Факторы, влияющие на деградацию магнитных частиц *in vivo*

Возможность проведения неинвазивных измерений *in vivo* позволила нам провести первое масштабное сравнительное исследование деградации магнитных частиц в печени мышей. Для этого использовали как синтезированные нами цитрат-покрытые частицы магнетита, так и широкий ряд коммерчески-доступных наноагентов, свойства которых (гидродинамический размер,  $\zeta$ -потенциал, покрытие) суммированы в Таблица 2. Согласно нашим измерениям SQUID DC-намагниченности и MRQ, частицы всех трех производителей были суперпарамагнитными (нулевые значения коэрцитивности и остаточности) при комнатной температуре (Рис. 38) и проявляли нелинейные магнитные свойства. Анализ деградации проводили в течение одного года с измерением концентрации частиц один раз в неделю.

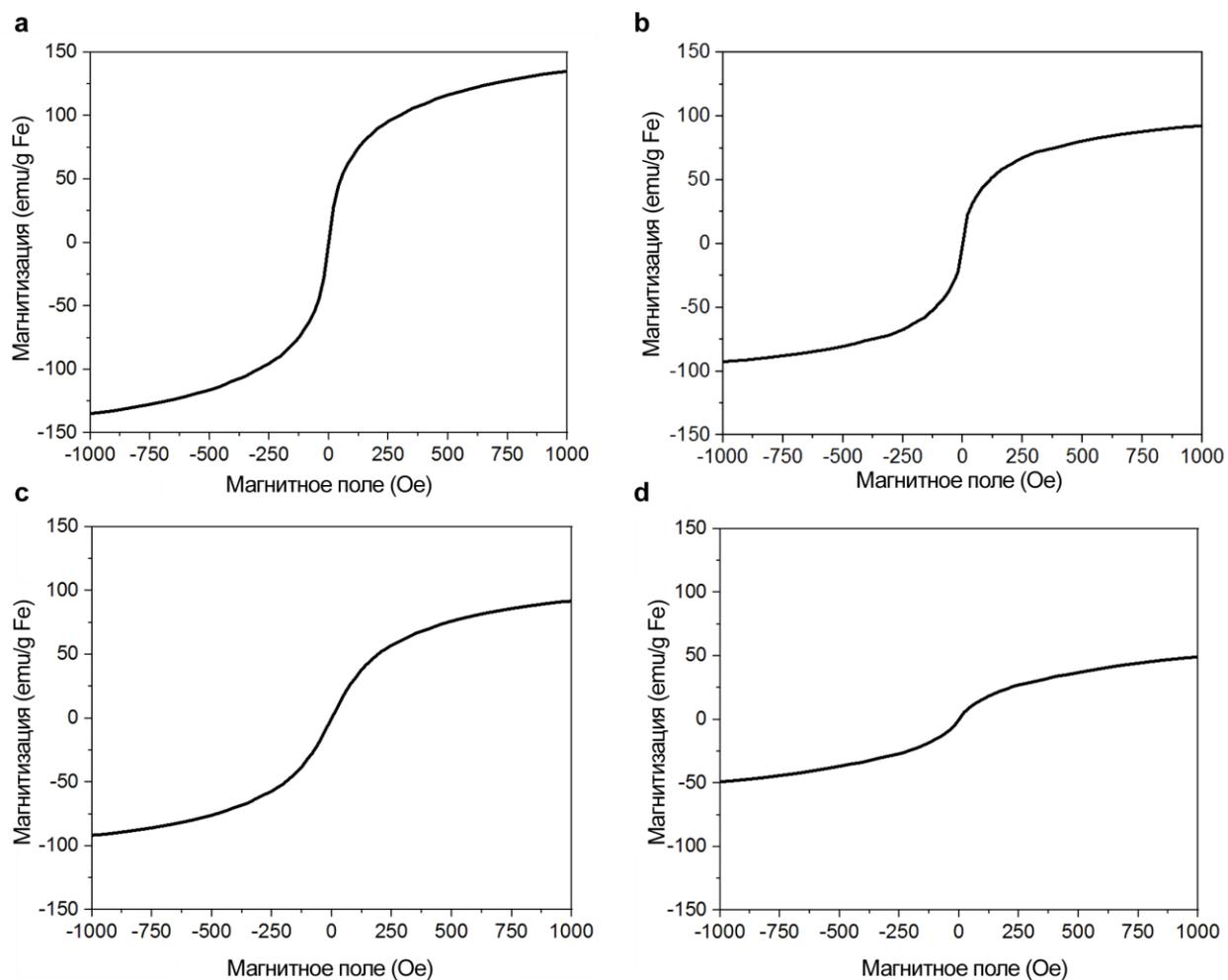


Рис. 38. Кривые намагниченности различных магнитных частиц, используемых в исследовании: а) магнетит с 50-нм цитратным покрытием; б) 100-нм FluidMAG-CMX; в) 200-нм пористый Эстапор; д) 1-мкм Spherotech с аминным покрытием. Все кривые намагниченности измерялись при комнатной температуре .

Таблица 2. Параметры магнитных частиц, использованных в исследовании.

Название частиц	Гидродинамический размер, нм	$\zeta$ -потенциал, mV	Покрытие	Время полудеградации, дни
Магнетит, покрытый цитратом, 50 нм	37 ± 17	-26 ± 7	Цитрат	16 ± 3
FluidMAG-ARA, 50 нм	68 ± 37	-22 ± 7	Глюкуроновая кислота	6.8 ± 0.7
FluidMAG-CMX, 50 нм	51 ± 22	-21 ± 13	Карбоксиметилдексатран	7.2 ± 2.7
FluidMAG-PAS, 50 нм	46 ± 16	-43 ± 13	Полиакриловая кислота	21 ± 4
FluidMAG-ARA, 100 нм	150 ± 50	-25 ± 6	Глюкуроновая кислота	15 ± 4
FluidMAG-CMX, 100 нм	120 ± 50	-16 ± 7	Карбоксиметилдексатран	28 ± 6
FluidMAG-PAS, 100 нм	120 ± 50	-40 ± 11	Полиакриловая кислота	24 ± 4
FluidMAG-PS, 100 нм	130 ± 70	-58 ± 8	Полистеринсульфат	30 ± 6
FluidMAG-Chitosan, 100 нм	120 ± 40	39 ± 10	Хитозан	22 ± 7
FluidMAG-PEG/P, 100 нм	100 ± 40	-30 ± 9	Полиэтиленгликоль $\alpha$ - $\omega$ -дифосфат	38 ± 6
FluidMAG-ARA, 200 нм	210 ± 60	-22 ± 5	Глюкуроновая кислота	14 ± 1
FluidMAG-CMX, 200 нм	200 ± 80	-24 ± 8	Карбоксиметилдексатран	32 ± 4
FluidMAG-PAS, 200 нм	160 ± 70	-40 ± 11	Полиакриловая кислота	66 ± 8
Estapor-solid, 200 нм	220 ± 70	-36 ± 12	Полистерин с карбоксигруппами	430 ± 40
Estapor-porous, 220 нм	270 ± 50	-48 ± 4	Полистерин а амино группами	48 ± 5
Spherotech, carboxyl, 1 мкм	930 ± 270	-32 ± 7	Полистерин с карбоксигруппами	8.4 ± 0.9
Spherotech, amine, 1 мкм	1100 ± 250	7 ± 5	Полистерин а амино группами	22 ± 4

### ***Влияние дозы наночастиц***

Магнетит-цитратные наночастицы внутривенно вводились в мышей в различных дозах от 50 мкг до 3 мг на мышшь (что эквивалентно 2.5 – 150 мкг/г ткани). Деградация частиц во всех дозах можно описать моноэкспоненциальной кривой (см. линейное приближение в логарифмической шкале на Рис. 39а). При этом с увеличением дозы частиц в 60 раз росло время их деградации в организме от  $4.9 \pm 0.7$  дней до  $40.8 \pm 0.7$  дней. При этом замедление скорости деградации частиц нелинейно зависело от вводимой дозы (Рис. 39б). Для проведения всех дальнейших экспериментов нами была выбрана средняя доза (15 мкг/г), при котором уже было высокое соотношение сигнал/шум, но при этом деградация материала происходила сравнительно быстро.

Наши данные по поведению дозозависимой деградации частично соотносятся с опубликованными работами. Так, в работе [97] было показано, что 8-нм маггемит, покрытый гидрофильными производными глюкозы в дозе 50 nmol/g распадался с периодом полураспада ~ 1 неделя, а для дозы 1000 nmol/g – более 44 дней. Также, было показано, что малые дозы НС с димеркаптоянтарным кислотным покрытием (2.5  $\mu\text{g/g}$ ) разлагаются до ферритина в течение всего одних суток [106]. Однако, в меру наших знаний, не было показано нелинейности в зависимости скорости метаболизма от дозы частиц. По нашим данным, для высоких доз может существовать предельная скорость деградации, определяемая физиологическими процессами в печени. Так, для магнетит-цитратных НЧ аппроксимация дает  $t_{1/2}$  насыщения составляла приблизительно 43 дня.

Такое поведение можно объяснить следующими фактами: при малых дозах скорость разложения может определяться средним количеством частиц в одной лизосоме, доступностью хелатообразующих агентов, количеством ферритина и других железосодержащих белков участвующих в метаболизме и др. При высоких дозах влияние большинства этих факторов нивелируется, так как железа в одной лизосоме становится многократно больше и скорость уже может определяться лишь скоростью естественного процесса поверхностной коррозии частиц в лизосомальных условиях. Также частично зависимость может объясняться усилением биохимических процессов переработки железа. Так метаболизм железа зависит от ряда белков, таких как ферритин, ферропортин, DMT1 и других [154]. Их экспрессия может увеличиваться при поглощении высоких доз железосодержащих НЧ и ускорять их деградацию. Определение точного механизма требует дальнейшего изучения.

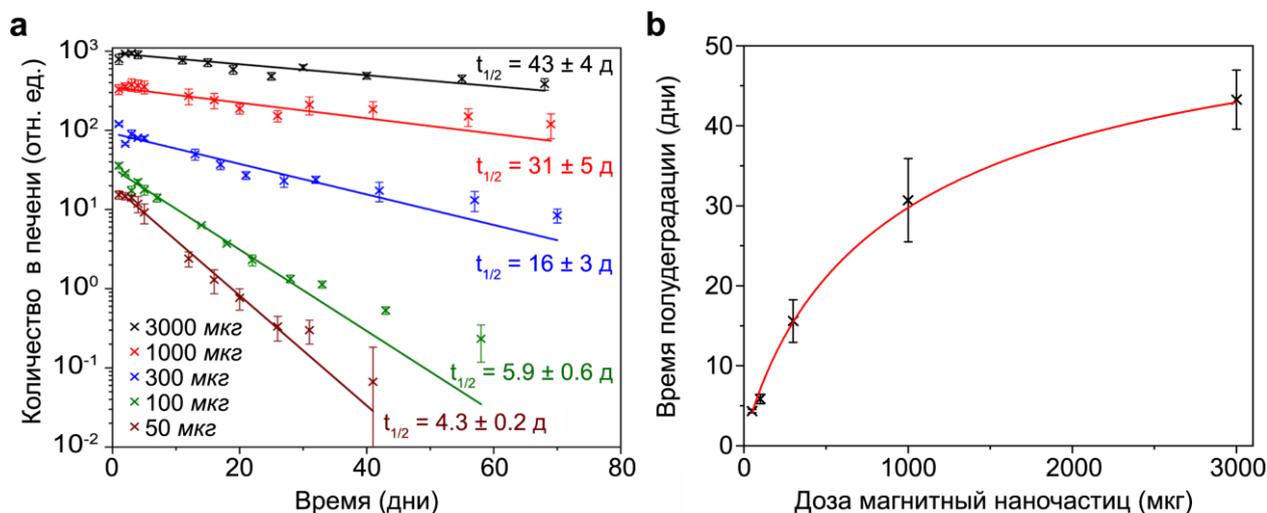


Рис. 39. Зависимость скорости деградации магнитных частиц от вводимой дозы наноагента: (а) кинетики деградации цитрат-покрытых частиц и (б) среднее время полужизни различных доз НЧ.

#### ***Гидродинамический размер***

Для изучения влияния размера магнитных наночастиц на время их биodeградации было проведено три серии экспериментов с использованием 50, 100 и 200 нм магнитных наночастиц, покрытых полимерами глюкуроновой кислоты (ARA), карбоксиметилдекстраном (CMX) или полиакриловой кислоты (PAS). Для всех трех типов частиц мы наблюдали увеличение скорости деградации частиц с уменьшением их гидродинамического размера (Рис. 40а-с). Время полудеградации 50-, 100- и 200-нм частицы 6.6, 14.2, 13.6 дней для ARA; 7.2, 24.7, 31.6 дней для CMX и 20.3, 25.1, 97.4 дней для PAS, соответственно. Интересно, что 100-нм и 200-нм FluidMAG-ARA частицы деградировали одинаковое время. Чтобы пояснить этот феномен далее изучили как изменяется размер FluidMAG-ARA частиц в условиях лизосом (pH 4.8). Нами было обнаружено, что из-за процесса агрегации, разница в гидродинамическом размере между 100- и 200 нм частицами оказывалась существенно меньше, чем между 50нм и 100 нм. Таким образом, увеличение удельной площади поверхности, доступной для растворения ведет к ускорению метаболизма частиц и важно учитывать их агрегационную стабильность как в крови, так и в условиях лизосом.

#### ***Заряд поверхности наночастиц***

Другим параметром, который может оказывать влияние на скорость биodeградации наночастиц, может быть, заряд их поверхности. Так как истинный заряд наночастиц тяжело определить, часто в качестве аналога используют понятие  $\zeta$ -потенциала – электрического потенциала кинетического слоя наночастиц. Наночастицы с различными  $\zeta$ -потенциалом

могут проявлять разную агрегационную стабильность в условиях крови и лизосом в ходе метаболизма, что скажется на скорости биоразложения.

Для изучения влияния потенциала частиц на их биodeградацию было проведено сравнение кинетик разложения двух идентичных по структуре 1-мкм частиц (Spherotech), в которых магнитные частицы покрывали снаружи полистирольный матрикс (Рис. 40d). Данные частицы имели одинаковый физический размер и строение и отличались между собой только зарядами поверхности (Рис. 40h).  $\zeta$ -потенциал был  $(7 \pm 5 \text{ mV})$  и  $(-32 \pm 7 \text{ mV})$  для аминированных и карбоксилированных частиц, соответственно. Положительно-заряженные частицы практически в два раза дольше деградировали в организме, чем отрицательно-заряженные (Рис. 40f). Интересно, что обычно в сыворотке наночастицы быстро покрываются белковой короной, которая практически уравнивает  $\zeta$ -потенциал любых частиц [9,126].

В модели растворения наночастиц магнетита с цитратным покрытием в различных буферах *in vitro*, было показано, что оксиды железа быстрее деградировали в кислотных условиях с рН 3-4. Обычно положительно заряженные частицы с первичными и вторичными аминами в их структуре будут иметь их в протонированном состоянии. Таким образом, они могут выполнять функцию слабых протонных губок [155,156], выводя протоны из окружения, одновременно притягивать гидроксил ионы положительным зарядом, следовательно повышая локальный рН около наночастиц. В некоторых случаях, было даже показано что играющие роль протонных губок могут самостоятельно выходить из эндосом [157,158], что еще сильнее затрудняет их метаболизм. Отрицательно-заряженные частицы также будут притягивать протоны противоположным зарядом, что понизит локальный рН около них и приведет к более быстрому разложению.

#### ***Влияние внутренней структуры наночастиц на их деградацию***

Существенное влияние на скорость растворения частиц может оказывать пористость частиц и расположение магнитных ядер внутри полимерного матрикса. Площадь доступной для эрозии поверхности магнитных ядер, в частицах с пористым матриксом многократно выше, что должно ускорять их деградацию. Чтобы показать влияние этого фактора было проведено сравнение деградации двух типов 220-нм частицы Estapor, одни из которых имели магнитные ядра, распределенные по пористому полистирольному матриксу (Рис. 40d), а вторые были покрыты сплошным покрытием из полистирола со средней шириной

$39 \pm 17$  нм (Рис. 40e). Размер магнитных ядер у обеих частиц был одинаковым и составлял  $152 \pm 27$  нм и  $146 \pm 24$  нм, для пористых и солидных частиц, соответственно.

Кинетики биоразложения наночастиц в организме после их внутривенного введения различались кардинально. В то время как пористые частицы имели стандартную моноэкспоненциальную кривую падению со средним временем полужизни 40 дней (Рис. 40f), солидные частицы имели время полужизни приблизительно 1 год. Более того, в первые 2 месяца анализа деградации не отмечалось существенного падения магнитного сигнала для солидных частиц, что может объясняться медленной биodeградацией труднорастворимого полистирола [159].

Такое же поведение с задержкой растворения на 20 дней наблюдалось для 500-нм частиц покрытых  $\text{SiO}_2$  (SiMAG-Carboxyl). Непористый оксид кремния также является труднорастворимым соединением [160] в организме, и магнитные частицы, покрытые кремниевой оболочкой имели время полужизни около 100 дней. Более того, для данных наночастиц кинетика метаболизма отклонялась от моноэкспоненциальности.

Стоит отметить, что архитектурой строения частицы также объясняется крайне быстрое растворение 1- $\mu\text{m}$  Spherotech частицы, происходящее со скоростью как у 50-100 нм частиц покрытых полимерами (Таблица 2). Данные частицы имели также труднорастворимый матрикс полистирола, но магнетит у них наблюдался только на поверхности наночастиц. При этом средний размер индивидуальных магнитных ядер был всего  $21 \pm 5$  нм, что в сочетании с высокой доступностью их к действию внешних условий среды, обеспечивало быстрый метаболизм.

### ***Покрывтие***

Покрывтие способно влиять на скорость разложения ядер частиц оксида железа не только само по себе, ограничивая к ним доступ, но и вторичными факторами. Например, наночастицы с разными покрытиями способны формировать немного разную белковую корону частиц, приводя к различному распределению наноагентов по органам и субтипам клеток [161]. Покрывтие также может менять агрегационную стабильность частиц в крови, и, следовательно, среднюю концентрацию частиц в одной лизосоме [162]. Также, для некоторых покрытий была описана повышенная вероятность перехода наночастиц в гепатоциты в печени [153], где возможно осуществление их экскреции с желчью без разложения.

Сравнение ряда 50-, 100- и 200-нм частиц с покрытиями из ARA, CMX и PAS показало, что вне зависимости от размера скорость деградации напрямую зависела от их покрытия и для трех исследованных размеров частиц замедлялась в ряду ARA; CMX; PAS. Сравнение 100-нм магнитных частиц с различными полимерными покрытиями показал, что время их полужизни в организме увеличивалось в ряду покрытий: полиглюкуроновая кислота < хитозан < карбоксиметилдекстран  $\approx$  полистиролсульфонат  $\approx$  полиакриловая кислота < полиэтиленгликоль  $\alpha$ -, $\omega$ -дифосфат (Рис. 40). Интересно, что медленнее всего разлагались именно полиэтиленгликоль-покрытые частицы, ведь это покрытие часто используется для улучшения доставки наночастиц в патологические ткани. Для частиц с различными полимерными покрытиями нами не было обнаружено четкой корреляции между гидрофобностью полимера и скоростью разложения магнитного материала в их составе. (Таблица 3, Рис. 41).

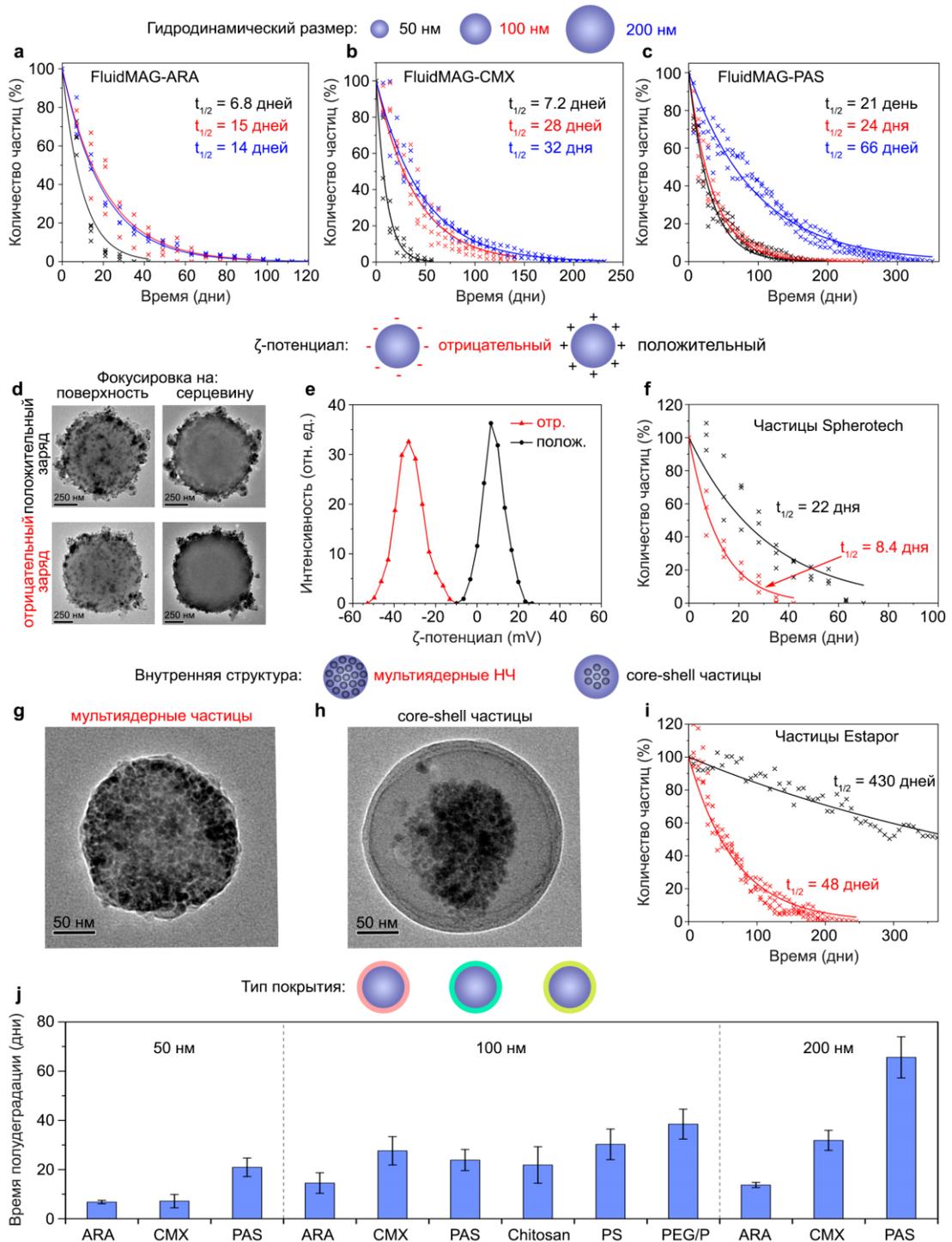


Рис. 40. Биодegradация МЧ с различными свойствами в печени мыши. (а-с) Зависимость кинетики деградации от размера частиц: 50, 100, 200 нм NP покрытых глюконовой кислотой (а), карбоксиметилдекстраном (б), полиакриловой кислотой (с); (д-ф) Влияние  $\zeta$ -потенциала на кинетики деградации частиц: электронные микрографии частиц (д), распределение частиц по заряду (е) и кинетики их биодegradации (ф); (г-и) Влияние пористости на деградацию частиц: электронные микрографии пористых (г) и солидных (д) частиц и кинетики деградации этих частиц (и); (е) Зависимость времени полудеградациии магнитных частиц от типа их покрытия и размера наночастиц. Свойства и обозначения наночастиц описаны в Таблица 2.

Таблица 3. LogP значения полимерных покрытий магнитных наночастиц.

Название частиц	Полимерное покрытие	LogP мономера
FluidMAG-ARA, 100 нм	Глюкуроновая кислота	-2.3
FluidMAG-CMX, 100 нм	Карбоксиметилдекстран	-6
FluidMAG-PAS, 100 нм	Полиакриловая кислота	0.3
FluidMAG-PS, 100 нм	Полистиренсульфонат	1.4
FluidMAG-Chitosan, 100 нм	Хитозан	-21.4
FluidMAG-PEG/P, 100 нм	Полиэтиленгликоль $\alpha$ - $\omega$ -дифосфат	-1.4

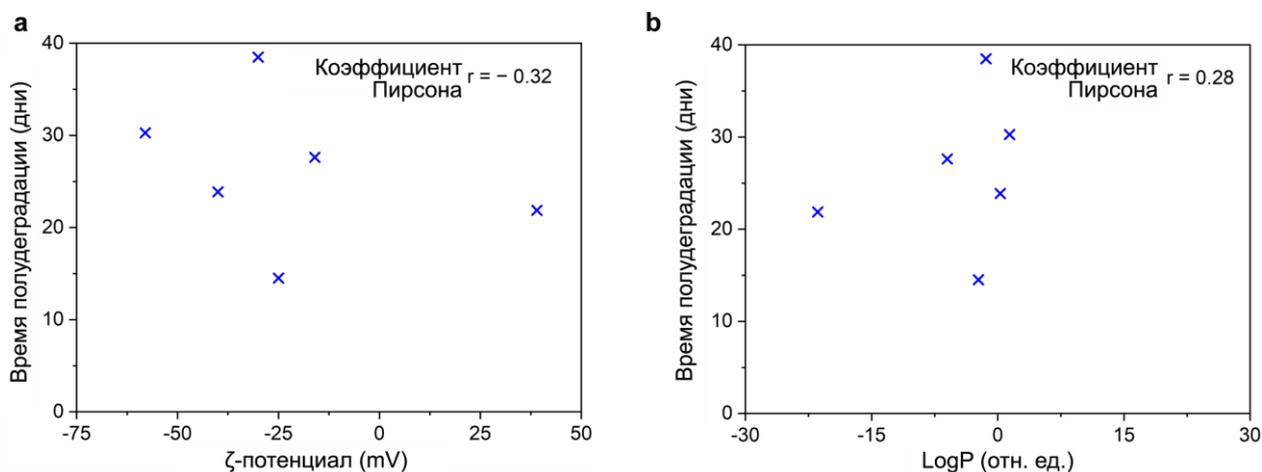


Рис. 41. Корреляционный анализ Пирсона времени полудеградаци наночастиц по сравнению с (а)  $\zeta$ -потенциалами или (б) значением LogP 100-нм магнитных частиц с полимерным покрытием.

#### 4.6.5. Биологические аспекты деградации МЧ *in vivo*

Снижение сигнала МРQ со временем свидетельствует об уменьшении количества нелинейных магнитных материалов в исследуемых органах (преимущественно в печени и селезенке). Этот процесс может происходить в силу различных причин: растворения частиц, их выведения в желчь или мочу без деградации, превращения кристаллов нелинейного магнитного материала в парамагнитную (неопределяемую) форму железа и т. д. Таким образом, по полученным данным, деградация частиц *in vitro*, которая происходила в основном из-за кислотно-опосредованного растворения магнитных кристаллов, неправильно отражала скорость разложения в организме. Например, 1-мкм частицы Spherotech, которые деградировали наиболее быстро *in vivo* (период полураспада 8,4 дня), теряли только 22% железа *in vitro* (Рис. 32с) в месяц. В то же время для частиц Estapor соответствующие значения составляли 48 дней и до 62% высвобождения железа *in vitro*

(Рис. 32b). Это несоответствие, по-видимому, указывает на участие других путей биодegradации железа *in vivo* помимо кислотного растворения.

Чтобы получить более глубокое понимание деградации частиц *in vivo*, в работе изучили влияние печени и селезенки на изменения биологических и магнитных свойств во время деградации наночастиц магнетита, покрытых цитратом, с использованием различных аналитических методов. В частности, наночастицы вводили внутривенно мышам, а затем печень, селезенку, фекалии, желчь и мочу собирали для анализа. Концентрация железа в тканях анализировалась методом ICP-MS, магнитные свойства органов – по MPQ и SQUID DC-намагниченности, количество железоположительных клеток, а также расположение железа внутри ткани – гистологией с окрашиванием по Перлсу.

Измерения MPQ показали, что деградация частиц в печени и селезенке происходила с разной скоростью (Рис. 43a). Так, через месяц после инъекции частиц их интегральное количество в печени и селезенке уменьшилось в среднем на 27% и 54% соответственно. Данные масс-спектрометрии, однако, показали различный временной профиль распределения железа для каждого из органов (Рис. 43b). В печени концентрация железа в 1 день увеличивалась со  $160 \pm 10$  до  $840 \pm 90$  мкг/г ткани, при этом в течение месяца концентрация железа значительно снижалась до  $500 \pm 20$  мкг/г ткани. В селезенке количество железа после инъекции частиц увеличилось с  $580 \pm 90$  до  $880 \pm 40$  мкг/г ткани, а затем варьировалось в этом диапазоне в течение месяца. Несовпадение между MPQ и ICP-MS можно объяснить процессами биогенного транспорта железа из печени в селезенку, о которых сообщалось ранее [97].

Для изучения возможных путей экскреции железа были проведены исследования MPQ и ICP-MS мочи и кала мышей (Рис. 43c-f). Оба метода показали, что ни частицы, ни растворимые формы железа не выводились с мочой. Это также подтверждается нашими данными биораспределения, в которых менее 0,15% введенной дозы частиц было обнаружено в почках (Рис. 33a). В то же время наблюдалось увеличение сигнала MPQ в фекалиях на 1 и 7 день после инъекции частиц (Рис. 43e). Тем не менее, прямые измерения сигнала MPQ и концентрации железа в собранной желчном пузыре желчи не показали повышения уровня железа в течение месяца (Рис. 42). Поэтому выведения интактных частиц посредством билиарной экскреции не наблюдалось.

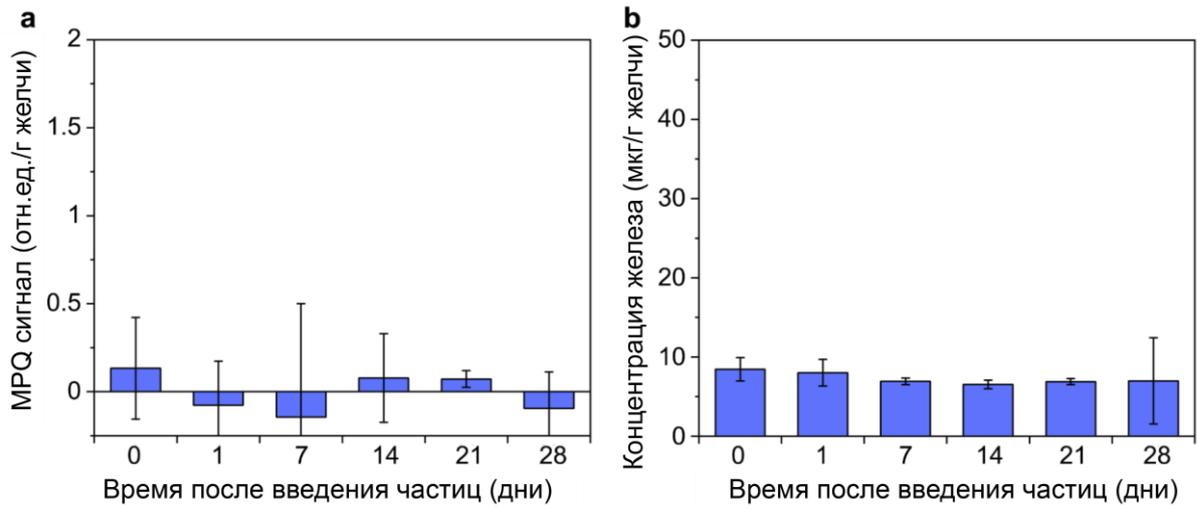


Рис. 42. Содержание магнитных частиц (а) и Fe (б) в желчи, собранной из желчного пузыря,  $n = 3$  образца для каждой точки данных. Нулевая временная точка показывает момент перед инъекцией наночастиц.

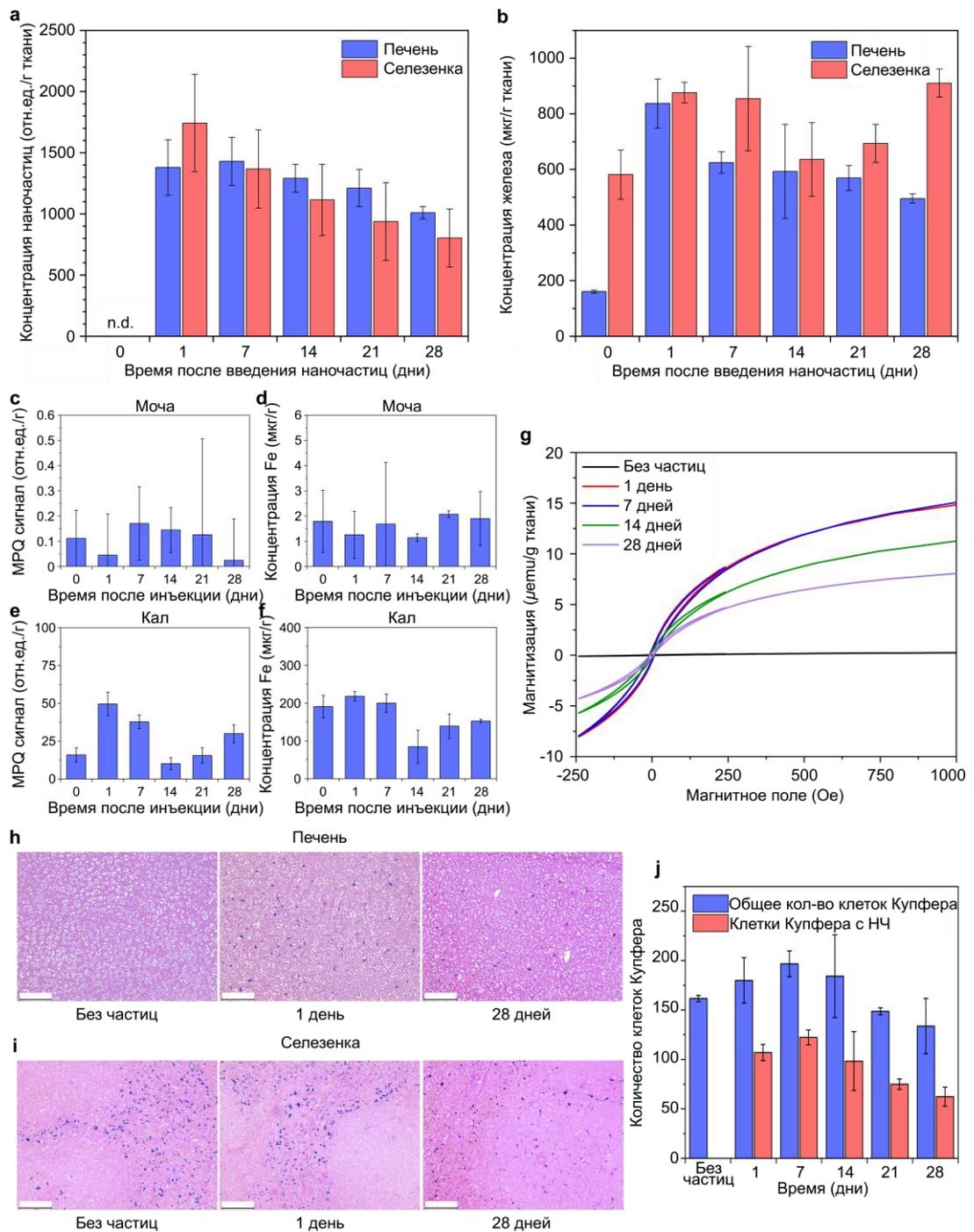


Рис. 43. Магнитная и биологическая оценка биodeградации наночастиц магнетита с цитратным покрытием у мышей: анализ *ex vivo* сигнала МРQ (a) и концентрации железа в печени и селезенке в разное время после инъекции наночастиц (b), n.d. – не обнаружено.  $n = 3$  мыши для каждой точки данных. (c-f) Анализ содержания магнитных частиц (c, e) или железа (d, f) в моче (c, d) и фекалиях (e, f),  $n = 3$  образца для каждой точки данных. Нулевая временная точка показывает момент перед инъекцией наночастиц. (g) SQUID-анализ намагниченности тканей печени в различные моменты времени после инъекции наночастиц,  $n = 3$  образца печени были усреднены для каждой кривой. (h, i) Репрезентативные гистологические изображения печени (h) и селезенки (i) в различные моменты времени после инъекции наночастиц. Места локализации железа выглядят в виде синих точек из-за реакции Перлса. Шкала соответствует 100 мкм. (j) Анализ железоположительных и общего количества клеток Купфера в печени. Данные усреднялись по площади слайда, увеличение  $\times 200$ ,  $n = 3$  образца, используемых для анализа.

Анализ намагниченности SQUID показал, что до инъекции частиц печень имела петлю гистерезиса с низкой намагниченностью насыщения (Рис. 44). Нелинейная зависимость намагниченности может быть отнесена к присутствию антиферромагнитного ферритина в органе, в то время как присутствие коэрцитивной силы может проистекать из остаточных или смещенных полей в магнитных катушках SQUID, чего трудно избежать [163]. В то же время при амплитуде магнитного поля 60 Oe, т.е. в типичных условиях измерений MPQ, намагниченность печени увеличилась в 73 раза. Затем, через 7, 14 и 28 дней после инъекции частиц, намагниченность при 60 Oe уменьшилась на 4, 30 и 46 % соответственно. Это соответствовало снижению сигнала MPQ на 3,5, 23 и 42 % для тех же образцов печени.

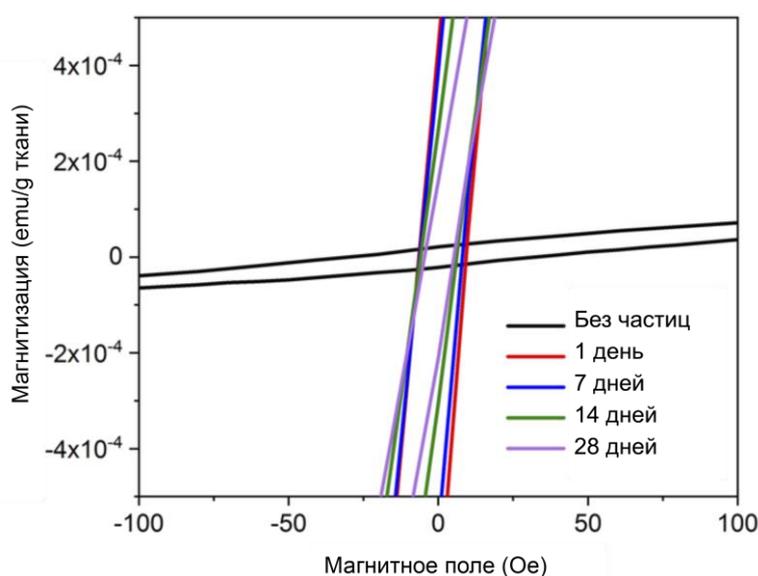


Рис. 44. Намагниченность тканей печени в различные моменты времени после инъекции наночастиц, измеренных SQUID,  $n = 3$ , образцы печени усредняли для каждой кривой.

Наконец, было проведено гистологическое исследование тканей печени и селезенки, окрашенных либо гематоксилин-эозином (Рис. 45), либо по Перлсу и эозином (Рис. 43h, i; другие точки данных представлены на Рис. 46). Выраженных воспалительных, дистрофических или некротических изменений в печени обнаружено не было (см. гистологическую характеристику в Таблица 4) в течение месяца после инъекции частиц. С первых суток наблюдалась повышенная популяция клеток Купфера (Рис. 43j), которая возвращалась к нормальному значению только через 21 день после инъекции. Около 60% клеток Купфера в первый день содержали коричневые гранулы в цитоплазме, что свидетельствует об эндоцитозе частиц. Количество этих частицсодержащих макрофагов

снизилось на 42% на 28-й день после инъекции МЧ (Рис. 43j). Окрашивание тканей по Перлсу прусским синим подтвердило эти наблюдения. Большая часть железа была поглощена клетками Купфера, и только на 1-й день наблюдалось небольшое количество частиц в сосудах печени. После первой недели все частицы оставались в макрофагах, и количество железоположительных клеток со временем уменьшалось (Рис. 43i, поддерживающий Рис. 46).

Гистологический анализ селезенки показал, что до инъекции МЧ она содержала сидерофаги с железом в красной пульпе. Затем введение частиц вызывало увеличение содержания мегакариоцитов и сидерофагов в селезенке, при этом их количество оставалось высоким в течение месяца. Кроме того, наблюдалась незначительная гиперплазия лимфоидных фолликулов с активацией зародышевых центров, которая была особенно выражена через 7 дней после инъекции частиц. Мы не наблюдали каких-либо других токсических эффектов в селезенке (Таблица 4). Окрашивание по Перлсу показало, что в первые сутки внутри макрофагов в красной пульпе и краевой зоне было обнаружено большое количество железа. Затем было обнаружено перераспределение железа по ткани: в течение первой недели локализация железа вблизи лимфоидных фолликулов уменьшилась, а на 28-й день наблюдали железоположительные клетки внутри белой пульпы (Рис. 43j, Рис. 46). Количество железоположительных клеток оставалось высоким в течение месяца исследования (см. качественное сравнение в Таблица 4).

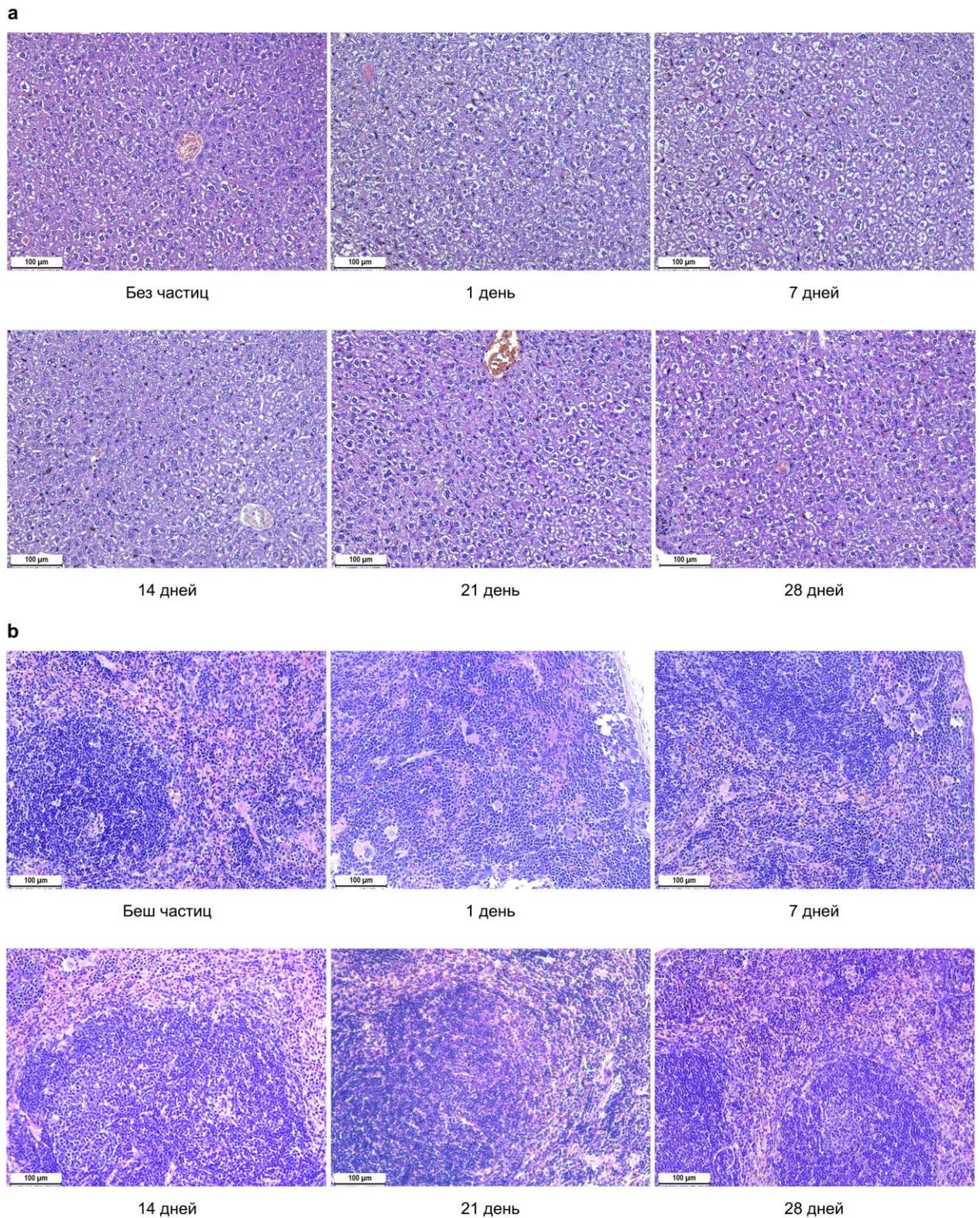


Рис. 45. Репрезентативные изображения окрашенных гематоксилин-эозином участков (а) печени и (б) селезенки в различные моменты времени после инъекции 1 мг наночастиц магнетита с цитратным покрытием.

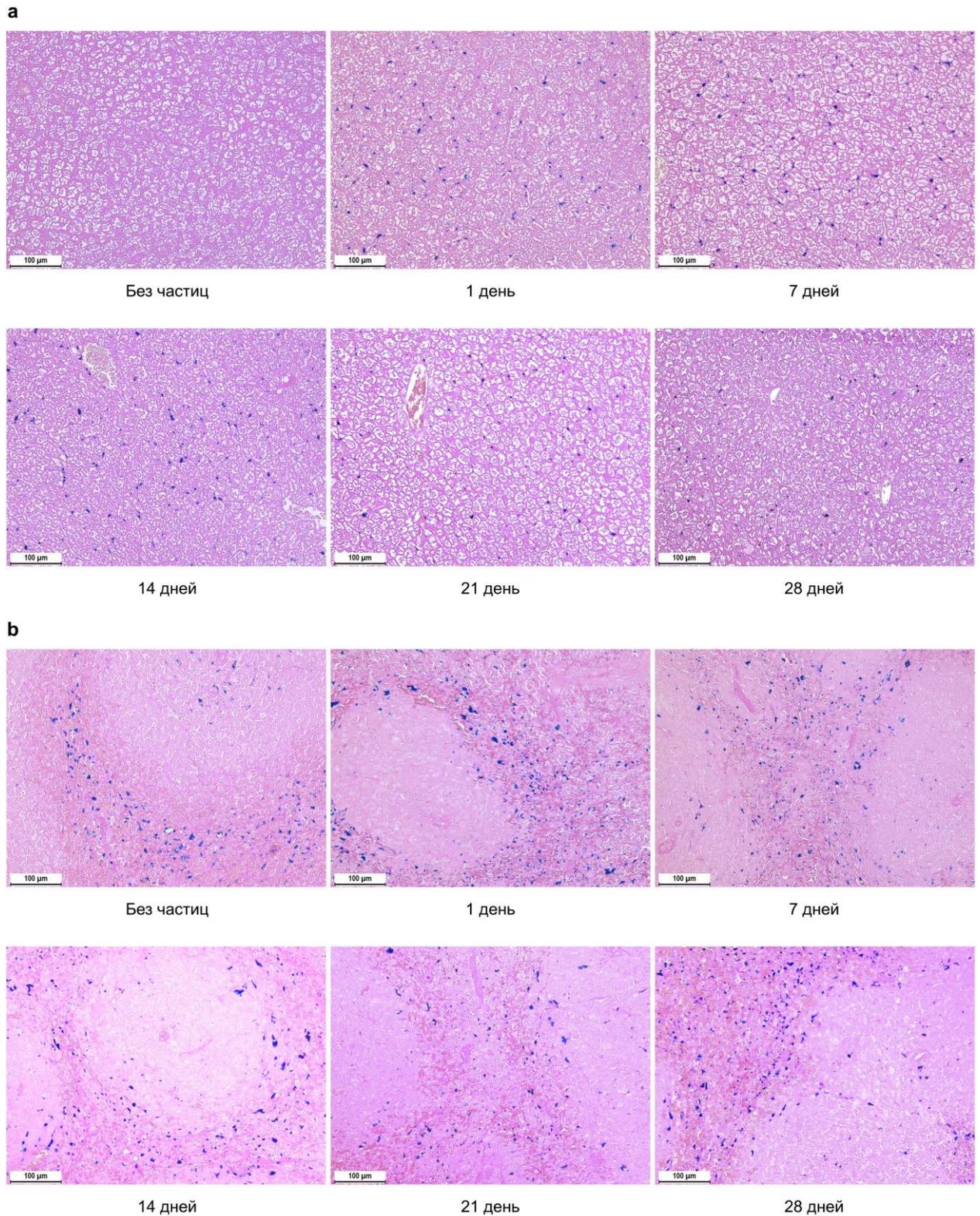


Рис. 46. Репрезентативные изображения окрашенных эозином и по Перлсу участков (а) печени и (б) селезенки в различные моменты времени после инъекций 1 мг наночастиц магнетита, покрытых цитратом.

Таблица 4. Качественный гистологический анализ тканей печени и селезенки. Каждый признак оценивался с использованием балльной системы в диапазоне от 0 (без признака) до 3 (наиболее выраженная).

Гистологические признаки	Без частиц			1 день			7 дней			14 дней			21 день			28 дней		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
№ Мыши																		
<b>ПЕЧЕНЬ</b>																		
1.Зернистая (белковая) дистрофия гепатоцитов	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
2.Жировая дистрофия гепатоцитов	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. Некроз гепатоцитов	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. Дезорганизация дольковой и балочной структуры печени	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.Увеличение содержания Купферовских клеток	0	0	0	3	2	2	3	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1
6.Усиление фагоцитоза в Купферовских клетках	0	0	0	3	2	2	3	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1
7.Воспалительная инфильтрация стромы	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8. Склероз стромы	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.Усиленное полнокровие центральных вен и межбалочных капилляров	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10.Усиленное полнокровие сосудов триад	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11. Васкулит	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12. Железосодержащие частицы	0	0	0	3	2	2	3	3	3	2	2	1	2	1	1	1	2	1
<b>СЕЛЕЗЁНКА</b>																		
1.Гиперплазия лимфоидных фолликулов	0	0	0	0	1	2	1	2	2	1	0	0	1	2	2	2	1	2
2.Плазматизация краевых зон фолликулов	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.Увеличение герминативных центров фолликулов	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0
4. Полнокровие красной пульпы	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.Увеличение содержания мегакариоцитов	0	0	0	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2
6.Увеличение содержания сидерофагов	0	0	0	3	2	2	2	3	3	1	2	1	2	2	2	2	2	2
7. Железосодержащие частицы	2	2	2	3	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2

Таким образом, все полученные данные показывают, что деградация магнитных частиц происходит по сложному механизму, включающему превращение частиц в МРQ-неопределяемые формы железа, транспорт железа между органами, рекрутирование новых макрофагов при биодegradации частиц и др. Полученные результаты согласуются с другими исследованиями, описывающими метаболизм частиц. Известно, что из-за токсичности растворимых форм железа его внутриклеточное хранение обеспечивается ферритином, белком, состоящим из 24 самоорганизующихся субъединиц, в которых может накапливаться до 4500 атомов железа. Перенос железа из частиц в ферритин был ранее исследован по Мёссбауэру [164] и АС восприимчивостью [106]. Повышенное количество ферритина часто регистрируется в непосредственной близости от лизосом содержащих частицы при анализе изображений тканей ТЭМ [117]. При сильной перегрузке клетки железом ферритин группируется и попадает в лизосомы, разрушаясь в них с образованием гемосидериновых соединений, которые наблюдались в сидерофагах при гистологических исследованиях. Следует отметить, что деградация ферритина в лизосомах увеличивает эффективную дозу частиц железа на органеллу, что, согласно нашему исследованию влияния дозы МЧ на скорость их деградации, должно замедлить катаболизм частиц. Поэтому ферритин не только хранит высвобождаемое железо, но и может быть инструментом для регулировки скорости высвобождения токсичных  $Fe^{2+}$  из лизосом.

Кроме того, железо  $Fe^{3+}$  может переноситься в плазму ферропортином и транспортироваться в другие ткани в комплексе с трансферрином [130]. В проведенных экспериментах перенос железа из печени в другие органы и длительное хранение Fe в селезенке могут объяснить поразительные различия между измеренной концентрацией железа в органах и соответствующим сигналом МРQ от суперпарамагнитных частиц. Биогенные формы железа не обнаруживаются МРQ, но могут быть обнаружены масс-спектрометрией, что указывает на увеличение деградированного железа в селезенке с течением времени. Гистологические исследования качественно подтверждают данные масс-спектрометрии: в то время как количество наночастиц в печени в период наблюдения уменьшалось, наблюдался высокий уровень сидерофагов и других железоположительных клеток в селезенке даже через месяц после инъекции МЧ.

Существует мало доказательств элиминации железа из организма при биодegradации оксидов железа. Колосняй-Таби и др. [110] сообщали о крайне низком (менее 0,04% ID) содержании частиц в почках и обсуждали общий потенциал их выведения

с мочой. Мехиас и др. [165] наблюдали повышение концентрации железа в кале через 7 и 30 дней после введения частиц. В наших экспериментах частицы не были обнаружены в моче, при этом их концентрация в кале была в 40 раз меньше, чем в печени. Кроме того, они не были обнаружены в желчи из желчного пузыря. Это говорит о более низкой роли механизма билиарной экскреции в метаболизме железа. Другим объяснением роста как сигнала MPQ, так и концентрации железа в кале может быть известный факт подавления всасывания железа в кишечнике из пищи при перегрузке железом в организме [130]. Оценка MPQ животного корма подтвердила, что он содержит определенное количество нелинейных магнитных материалов.

Стоит также отметить, что анализ намагниченности SQUID образцов печени показал нелинейное удержание кривых намагниченности при деградации частиц. На Рис. 47 показаны кривые намагниченности для образцов печени, нормализованные до их насыщения намагниченностью. Соответствие кривых указывает на то, что средний магнитный размер железных сердечников остается неизменным во время деградации частиц [97]. Аналогичные результаты были получены в других работах с использованием магнетита с полимерным покрытием, [164] частиц маггемита, покрытых производными глюкозы [97], и связанных с механизмом растворения «все или ничего» [105].

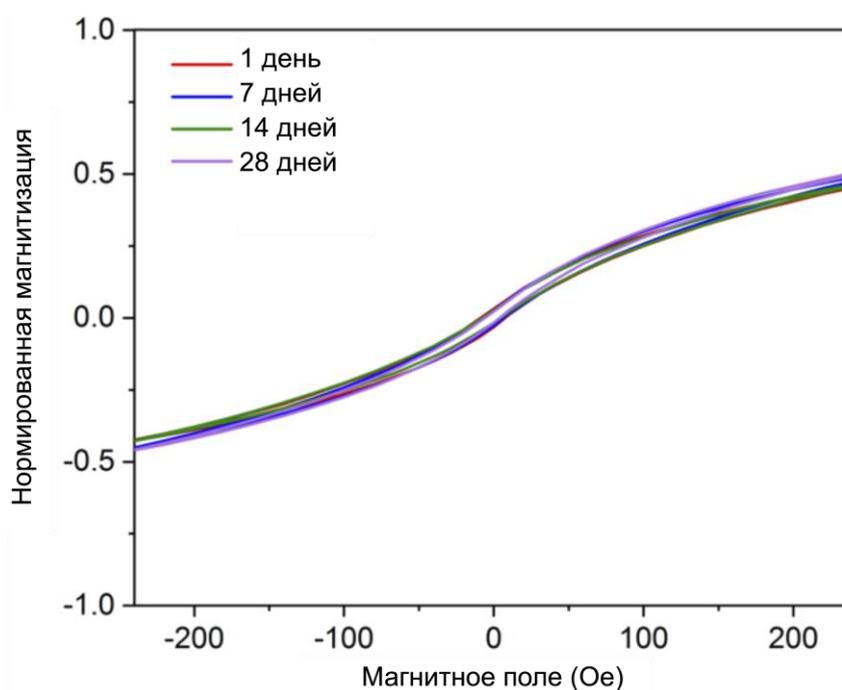


Рис. 47. Кривые намагниченности тканей печени в различные моменты времени после инъекции синтезированных наночастиц магнетита с цитратным покрытием. Данные нормализованы до значения намагниченности насыщения.

#### 4.7. Изучение влияния деградации МЧ на состояние организма

В данной части работы был отслежен полный цикл жизни 50-нм магнитных наночастиц от момента их введения в кровоток до старения в макрофагах печени и селезенки и с применением различных методик всесторонне изучили их взаимодействие с организмом. На примере наночастиц магнетита, покрытых глюконовой кислотой было показано, что данные агенты находятся в организме в течение нескольких месяцев с временем полуразложения 21 день. При деградации частиц не обнаруживается значительной токсичности, однако наблюдается перераспределение железа как между печенью и селезенкой, так и между клетками внутри органов. Кроме того, впервые показано статистически значимое влияние деградации наночастиц *in vivo* на увеличение экспрессии железосодержащих белков таких как: DMT1, ферропортин и трансферрин в печени.

##### 4.7.1. Характеризация используемых наночастиц

В этой части исследования изучалась биотрансформацию частиц из магнетита, покрытого полимером из глюконовой кислоты FluidMAG-ARA (Chemicell) с номинальным размером 50 нм. Размер частиц был выбран как средний для контрастных частиц, используемых для МРТ (обычный диапазон применяемых частиц 20–100 нм). Сканирующая электронная микроскопия показала высокую монодисперсность ядер магнетита с размером ядра  $20 \pm 3$  нм (Рис. 48а, б).

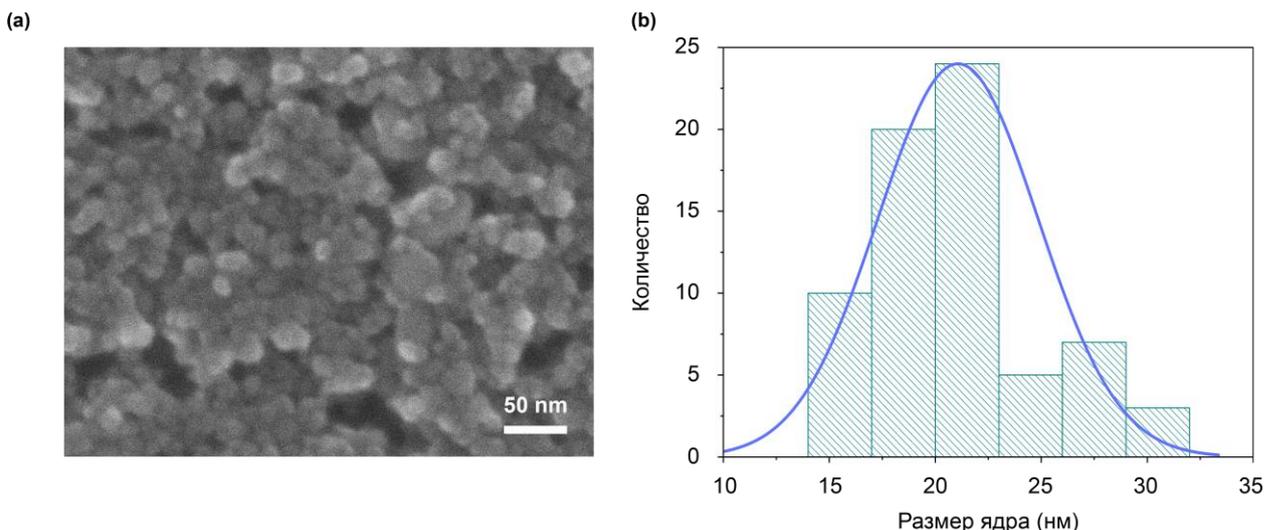


Рис. 48. Характеристика наночастиц FluidMAG-ARA. а) SEM изображение наночастиц FluidMAG-ARA. б) распределение по размерам НЧ, полученное из изображения SEM.

Измеренный методом динамического светорассеяния гидродинамический размер в воде составил  $35 \pm 8$  нм (Рис. 49а). Такое соотношение гидродинамического и физического размера ядра говорит о том, что наночастица, вероятно, представляет собой моноядерные частицы, покрытые полимером. Частицы имели  $\zeta$ -потенциал  $-23 \pm 5$  мВ (Рис. 49б), достаточно высокий для обеспечения коллоидной стабильности в сыворотке крови.

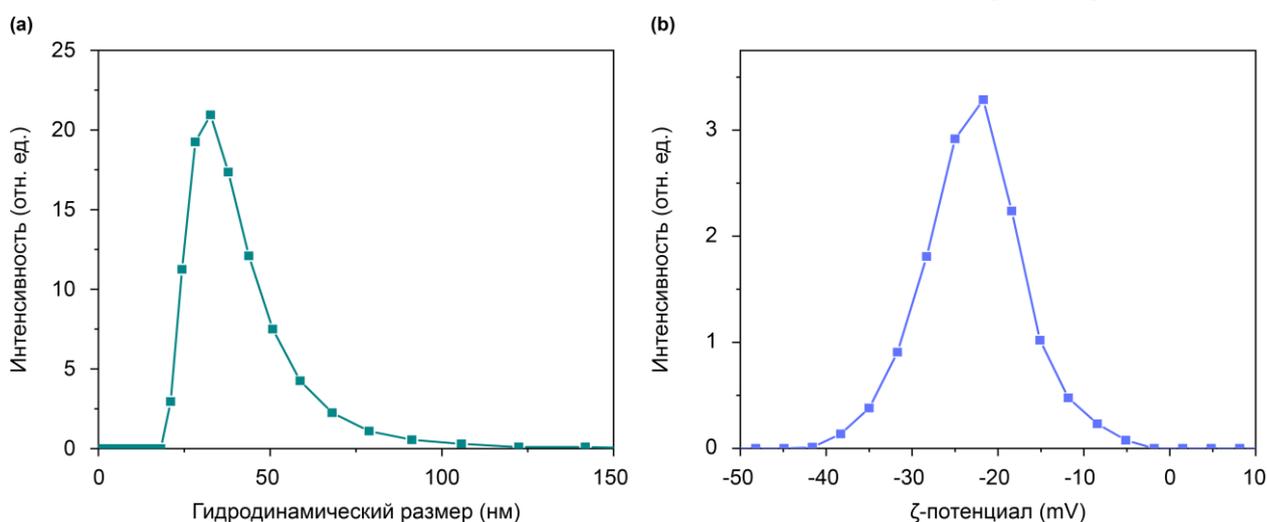


Рис. 49. Характеристика наночастиц FluidMAG-ARA. а) Гидродинамическое распределение по диаметру. б) распределение  $\zeta$ -потенциала частиц.

#### 4.7.2. Циркуляция наночастиц в крови

Затем были изучены параметры кратковременную судьбу магнитных наночастиц *in vivo*: кинетика их выведения из кровотока и исходное биораспределение (Рис. 50). Для детекции наночастиц использовали ранее разработанную систему анализа MPQ, позволяющей неинвазивно измерять их концентрацию в венах и артериях мыши. Падение концентрации наночастиц в кровотоке имело форму биэкспоненциальной кривой с быстрой частью с  $t_{1/2} = 2.2 \pm 1.1$  мин и медленной с  $t_{1/2} = 34.4 \pm 7.2$  мин. Полное время выведения наночастиц из кровотока составило 1.5 часа. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [99]. Эффект замедления выведения наночастиц из кровотока может говорить о насыщении процесса связывания частиц с распознающими рецепторами макрофагов и невозможности быстрого эндоцитоза и обратного рециклинга освободившихся рецепторов на поверхность. Данная особенность ранее была обнаружена при введении высоких доз (более 1 трлн) наночастиц *in vivo* [166], а также в модели изолированной печени *in vitro* описанной выше [167].

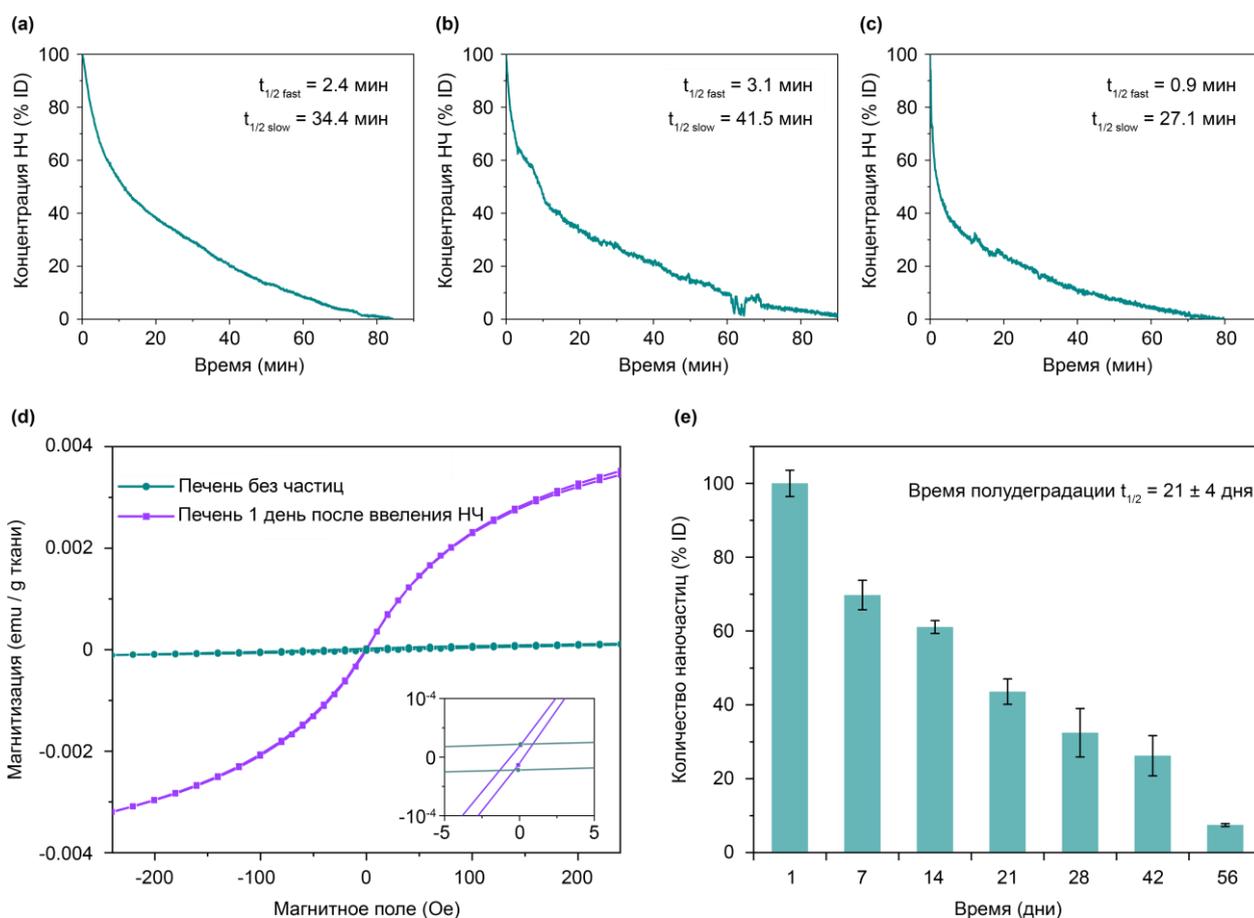


Рис. 50. Фармакокинетика наночастиц FluidMAG-ARA. (a-c) Кинетика циркуляции наночастиц FluidMAG-ARA у мышей. Кривые показывают динамику выведения НЧ из кровотока. d) SQUID-анализ намагниченности тканей печени до и через 1 день после введения наночастиц. e) Кинетика деградации НЧ *in vivo*.

#### 4.7.3. Изменения MPQ контрастирования НЧ при их деградации

С помощью SQUID магнитометрии далее измерили кривую намагниченности печени, как основного органа, поглощающего частицы (Рис. 50с). У нативной мыши кривая магнетизации была нелинейной, но выходила на насыщение с низкой амплитудой магнетизации. Такое поведение может объясняться наличием антиферромагнитного ферритина в печени. После введения 300 мкг 50-нм наночастиц магнетита кривая магнетизации печени демонстрировала суперпарамагнитное поведение. Нулевая остаточная намагниченность у образца печени говорит об отсутствии существенной агрегации магнитных ядер внутри ткани через 1 день после введения частиц. Значительная разница в магнетизации образца при сохранении нелинейного поведения магнетиков позволила в данной работе использовать магнитно-спектроскопические техники, такие как MPQ для мониторинга старения наночастиц FluidMAG-ARA.

Для неинвазивных измерений мышь фиксировалась в руке и магнитной катушкой сканировалась область печени. Максимальный детектируемый сигнал использовался для оценки концентрации частиц в органе. Количество детектируемого магнитного материала уменьшалось со временем с полужизнью  $t_{1/2} = 21 \pm 4$  дня (Рис. 50e). Через 2 месяца после введения наночастиц только  $7.4 \pm 0.4$  % от начального магнитного сигнала детектировалось в области печени. Данная кривая старения показывает диагностическое окно данных наночастиц для использования в качестве контрастов для магнитных спектроскопических подходов. Так, в течение двух месяцев частицы создавали значительный контраст на фоне печени для возможности их детекции *in vivo*.

#### **4.7.4. Зависимость МРТ контрастирования от деградации НЧ**

Одним из наиболее частых применений магнитных наночастиц в клинике является контрастирование ими изображений при МРТ диагностике. Ввиду этого далее исследовали МРТ изменение контрастирующих свойств наночастиц в процессе их деградации и переходе в немагнитные формы (Рис. 51a). Наилучшее контрастирование наблюдалось через 1 день после введения наночастиц, на снимках отчетливо видны контуры печени и селезенки. Через 7 дней после инъекции наночастиц на снимках все еще наблюдался высокий контраст в области печени, однако контуры селезенки визуализировались очень слабо. Далее в течение всего периода наблюдения контрастирование печени постепенно снижалось, однако даже через 8 недель после введения частиц на снимках все еще отчетливо был виден контур печени.

Таким образом, в процессе деградации наночастиц контрастирующие свойства постепенно снижаются на протяжении всего процесса деградации, однако через 2 месяца после введения частиц FluidMAG-ARA 50 nm они все еще способны контрастировать изображение печени на МРТ снимках.

#### **4.7.5. Эволюция биораспределения наночастиц в ходе их деградации**

Наблюдаемое падение сигнала в области печени может объясняться как старением частиц и переходом их в слабомагнитные или линейно-магнитные формы биогенного железа, так и перераспределением частиц из печени в другие органы. Поэтому эволюцию биораспределения наночастиц изучали в течение 2 месяцев после введения.

МРQ изучение биораспределения частиц *ex vivo* показало, что через 1 день после инъекции большая часть наночастиц  $96 \pm 6$  % введенной дозы (ID) была локализована в

печени (Рис. 51b), где они со временем деградировали и через 3 недели магнитный сигнал в органе упал более чем в 2 раза, а через 8 недель сигнал составлял уже не более 10 % от исходного. Также значимое количество наночастиц ( $2 \pm 0.4$  % ID) наблюдалось в селезенке (Рис. 51c), за неделю магнитный сигнал в ней упал в 2 раза, однако за последующие 2 недели он практически не изменился, что может говорить об активном перераспределении частиц между органами.

Печень и селезенка являются основными органами системы мононуклеарных фагоцитов, ответственных за выведение наночастиц из кровотока. Тем не менее, через 1 день после введения частиц значимое количество наночастиц от 0.1 до 0.8 % ID было обнаружено в легких, почках, костях, мозгу и сердце (Рис. 51d-i), однако уже через 7 дней магнитный сигнал от данных органов значительно снизился практически до предела детекции МРQ. Схожее перераспределение частиц из органов с неспецифическим накоплением ранее обнаруживалось для других частиц [97].

В данном исследовании только в почках наблюдалось постоянное накопление наночастиц на уровне 0.1 % ID, что может сигнализировать о почечной экскреции частиц до их трансформации в биогенное железо.

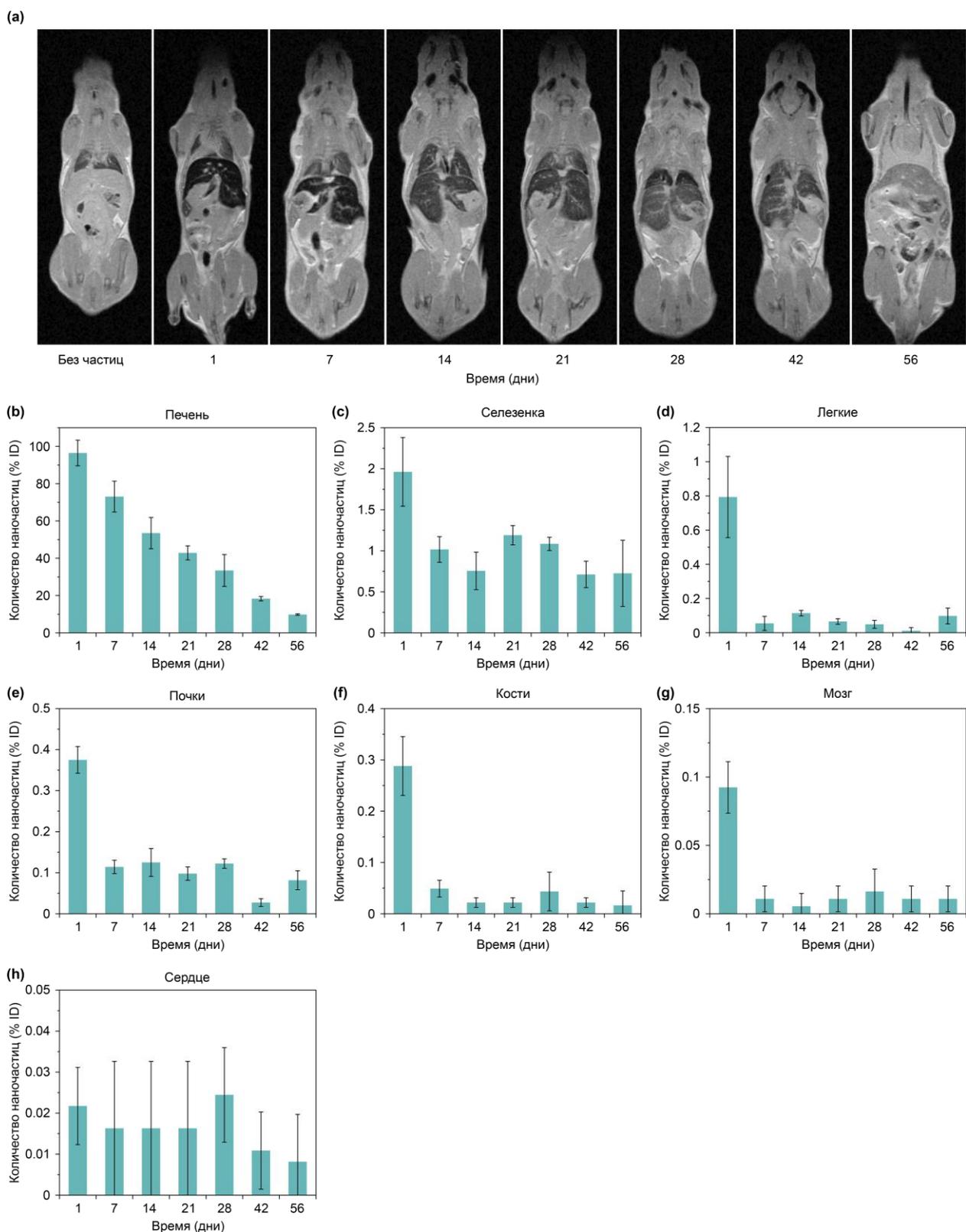


Рис. 51. Биораспределение наночастиц. (a) Данные МРТ 2-месячного исследования эволюции биораспределения наночастиц FluidMAG-ARA у мышей. (b-h) Изменение концентрации НЧ в течение 2 месяцев в различных органах: печени (b), селезенке (c), легких (d), почках (e), костях (f), мозге (g) и сердце (h).

#### 4.7.6. Влияние деградации МЧ на экспрессию железосодержащих белков

Железо является одним из наиболее важных металлов в организме. Его хранение и транспортировка осуществляется целым рядом белков [168]. Поэтому далее исследовали влияние сопровождаемой выделением железа биodeградации МЧ на экспрессию железосодержащих белков. Для этого в течение 28 дней после введения частиц в печени анализировали уровень экспрессии основных железосодержащих белков таких как трансферин, DMT1 (с IRE доменом и без), ферропортин и ферритин (легкая и тяжелая цепь) (Рис. 52a-f). Интересно заметить, что уровень экспрессии продуцируемого преимущественно в печени трансферина отвечающего за связывание  $Fe^{3+}$  ионов вырос почти в 2 раза уже через 24 часа после введения наночастиц и оставался высоким как через 2 недели, так и через 4 недели (Рис. 52a). Наблюдаемый эффект может быть обусловлен высоким уровнем его вовлеченности в транспортировку железа через плазму крови [169] осуществляющую перераспределение биогенного железа высвобождаемого при деградации наночастиц.

Похожая картина изменения экспрессии наблюдалась и у ассоциированного с транспортом и хранением  $Fe^{2+}$  ионов белка DMT1 (также известен как естественный резистентно-ассоциированный белок макрофагов 2) (Рис. 52b-c). Его экспрессия значительно выросла и через 2 недели после инъекции наночастиц была более чем в 2,5 раз больше, чем у контроля, однако за последующие 14 дней она упала и к 28 дню уже не была статистически отличима от начальной. Предположительно, такая зависимость может быть обусловлена высокой концентрацией высвобождаемого железа в течение первых 2-х недель деградации наночастиц однако, когда впоследствии к 4-й неделе скорость высвобождения железа падает, это в свою очередь может приводить к понижению экспрессии высокоэффективного переносчика железа DMT1 что может говорить об обратимости данного процесса.

Также через 28 дней было обнаружено значительное увеличение уровня экспрессии экспортера внутриклеточного железа ферропортина (Рис. 52d). Интересно заметить, что в течение первых 2-х недель уровень его экспрессии практически не изменялся, однако за последующие 2 недели он резко вырос более чем в 2,5 раза. Мы предполагаем, что это может быть связано не с быстрым высвобождением железа и его незамедлительной транспортировкой при деградации, а с более медленными процессами дальнейшего перераспределения и использования железа в организме, а также с процессами

формирования биогенных железосодержащих кластеров с целью его долгосрочного хранения.

На следующем этапе был проанализирован уровень экспрессии ферритина (Рис. 52e-f) как одного из основных внутриклеточных белков для хранения железа [130]. Уровень его экспрессии в печени также имел тенденцию на увеличение, однако данное увеличение не было статистически значимым. Мы думаем, что это может быть связано с тем, что основным депо для хранения железа является не печень, а селезенка (Рис. 53) ввиду чего колебания экспрессии данного белка в печени были незначительными [170].

Таким образом, деградация наночастиц сопровождается сложным многоступенчатым процессом транспортировки и хранения высвобождаемого железа, в ходе которого наблюдаются изменения уровней экспрессии как белков ответственных за транспортировку железа в пределах клетки, так и за транспортировку железа между органами через кровь.

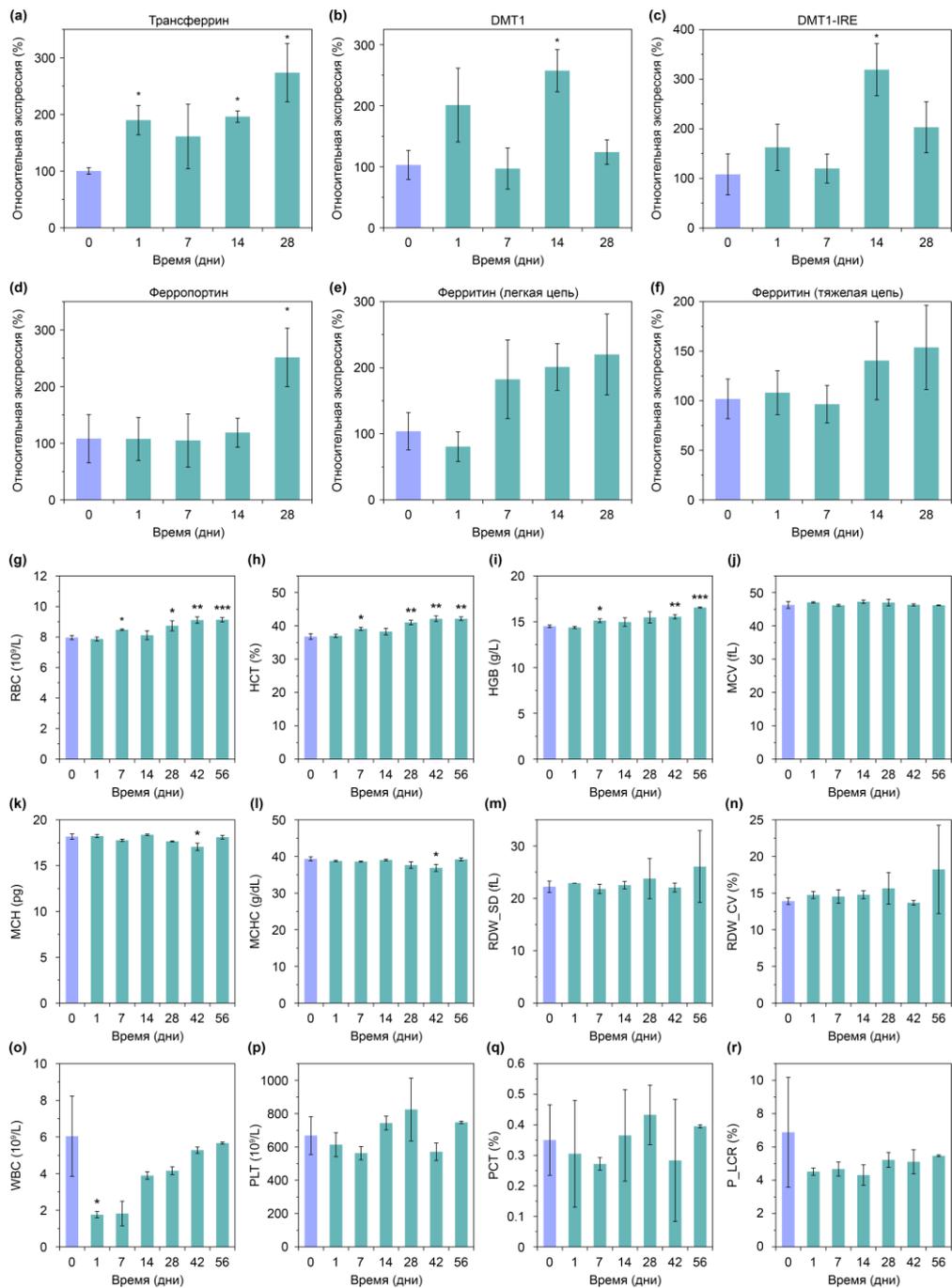


Рис. 52. Экспрессия генов железосодержащих белков и гематологический анализ крови. (a-f) Уровни экспрессии железосодержащих белков в печени в течение одного месяца после введения наночастиц: трансферрин, DMT1, железочувствительный элемент DMT1 (DMT1-IRE), ферропортин, легкие и тяжелые цепи ферритина (Ferritin\_L и Ferritin\_H соответственно). (g-r) Гематологический анализ в течение 2 месяцев после инъекции наночастиц включал оценку следующих показателей: количество эритроцитов (RBC), гематокрит (HCT), концентрация гемоглобина (HGB), средний корпускулярный объем (MCV), средний корпускулярный гемоглобин (MCH), средняя концентрация корпускулярного гемоглобина (MCHC), стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов (RDW\_SD), коэффициент изменения ширины распределения эритроцитов (RDW\_CV), количество лейкоцитов (WBC), количество тромбоцитов (PLT), тромбокрит (PCT), соотношение тромбоцитов и больших клеток (P\_LCR). Звездочки указывают на существенное отличие от контрольной группы (фиолетовый столбик на каждом графике): тест Уэлча, \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

#### 4.7.7. Гематологический анализ

Ранее было показано, что увеличение количества железа в организме может влиять на процессы кроветворения [171]. Для изучения потенциально воздействия продуктов деградации наночастиц на гемопоэз и тромбопоэз был проведен гематологический анализ в течение 56 дней с момента внутривенного введения частиц. (Рис. 52g-r).

Интересно отметить, что в процессе деградации на 7, 28, 42 и 56 дни эксперимента наблюдался рост количества RBC который составлял от 6 до 14 % и гематокрита 2-5 % (Рис. 52g,h), что является довольно значительным изменением однако остается в пределах нормы [172]. Практически аналогичная тенденция наблюдалась и по значениям гемоглобина (рост от 4% до 6%, на 7, 42, 56 дни). Возможно, что в процессе деградации наночастиц часть высвободившегося железа депонировалась в виде ферритина в макрофагах, что в последующем при дальнейшем его перераспределении привело к насыщению железом части ретикулоцитов, продуцирующих гемоглобин, что в свою очередь и стимулировало эритропоэз. Учитывая данные о том, что скорость синтеза гемоглобина отражает характерное высвобождение и постепенное созревание ретикулоцитов, наблюдаемый нами рост показателей RBC, HTC, HBG позволяет предположить, что МНЧ являются быстрым и, в то же время, пролонгированным источником доступного железа (биодеградация: около 30% - приходится на 1 день, 50% на 21 день после введения) и обладают выраженной эритропоэтической активностью.

Также важно отметить, что в процессе деградации наночастиц не наблюдалось существенных изменений со стороны эритроцитарных индексов (MCV, MCH, MCHC и RDW), что может говорить о том, что продукты деградации введенных частиц не обладают токсичностью и не нарушают гемопоэз.

Отдельный интерес представляют данные по общему количеству лейкоцитов (WBC). На 1 день после инъекции наночастиц наблюдалось снижение на 71% WBC в сравнении с контрольной группой. Наблюдаемая тенденция предположительно связана с тем, что в первые 24 часа в связи с попаданием в кровотоки наночастиц происходит активация макрофагально-моноцитарной системы. В результате, после поглощения большого количества свободных МНЧ, клетки лейкоцитарной системы, в том числе макрофаги, нагруженные наночастицами локализовались во внутренних органах с последующей гибелью, что и привело к локальному падению их количества в крови. Однако далее после полного выведения наночастиц из кровотока количество лейкоцитов

постепенно вернулось к референсным значениям. Отдельно следует отметить отсутствие существенных изменений со стороны тромбоцитов, и РСТ, свидетельствующее о том, что исследуемые МНЧ не оказывают существенного влияния на данный тип клеток и тромбопоэз.

Таким образом выявленные изменения косвенно свидетельствуют о том, что МНЧ и продукты их деградации могут стимулировать образование эритроцитов и гемоглобина без выраженных нарушений со стороны гемопоэза, приводить к кратковременному снижению лейкоцитов, а также не влияют на тромбопоэз.

#### **4.7.8. Гистологический анализ**

Для оценки токсичности проводили морфологическое исследование печени, селезенки и почек (Рис. 53). В печени через 1 и 7 суток после введения наночастиц некротических и дистрофических изменений не обнаружено. Через 14 суток после введения наночастиц выявлена мелко- и среднекапельная дистрофия, увеличено число неэпителиальных клеток (Купфера и лимфоцитов). Через 28 и 60 суток после введения наночастиц дистрофических изменений не выявлено. В печени при окраске по Перлсу наблюдались отложения гемосидерина через 1, 7, 14 суток после введения наночастиц. Через 28 суток отложения сохранялись, но их количество уменьшилось. Через 56 суток присутствовали только внеклеточные небольшие плотные отложения гемосидерина, вероятно, наблюдающиеся из-за гибели макрофагов.

В почках через 1, 7, 14 и 56 суток после введения наночастиц щеточная каемка клеток сохранена, отложений в просветах и эпителии прямых, извитых канальцев и собирательных трубочек не выявлено. Через 28 суток после введения наночастиц было выявлено одиночное эозинофильное отложение в прямом канальце, щеточная каемка клеток в целом сохранена. В отдельных канальцах наблюдалось разрушение щеточной каемки и дистрофические изменения эпителия. При окраске по Перлсу через сутки после введения наночастиц в эпителии некоторых канальцев почки было выявлено диффузное голубое окрашивание, преимущественно в люминальных отделах клеток. Через 7 суток интенсивность диффузного окрашивания была увеличена, а через 14 суток – уменьшена. Через 28 и 56 суток после введения НЧ окрашивание почки по Перлсу не выявлено существенных изменений.

В селезенке через сутки после введения наночастиц расширения светлых центров лимфоидных узелков не было выявлено. Через 7 суток наблюдалась гиперплазия белой

пульпы селезенки, увеличение лимфоидных узелков. Через 14 суток в селезенке были выявлены широкие светлые центры, гиперплазия ПАЛМ-зоны, много мегакариоцитов, отложения гемосидерина. Через 28 суток светлые центры селезенки были менее широкие по сравнению с 14 сутками, наблюдалась сужение маргинальных зон. Через 56 суток наблюдалось увеличение клеточности красной пульпы, много мегакариоцитов. Выявленные морфологические изменения в селезенке, по-видимому, являются следствием иммуномодулирующего/стрессорного воздействия. В селезенке у всех животных красная пульпа была полнокровна, что связано с развитием острого общего венозного полнокровия при выведении животных из эксперимента. При окраске по Перлсу во все сроки эксперимента после введения наночастиц был выявлен гемосидероз селезенки. В селезенке контрольной группы выявлялись отдельные отложения гемосидерина, через сутки после введения наночастиц – отложения гемосидерина в красной пульпе и единичные в центре лимфоидных узелков. Через 7 суток после введения наночастиц количество отложений гемосидерина увеличилось. На 14 сутки после введения наночастиц количество отложений гемосидерина уменьшилось в лимфоидных узелках, а на 28 сутки – в целом во всей селезенке. На 60 сутки после введения наночастиц отложения гемосидерина в селезенке было незначительное, однако больше, чем в контрольной группе.

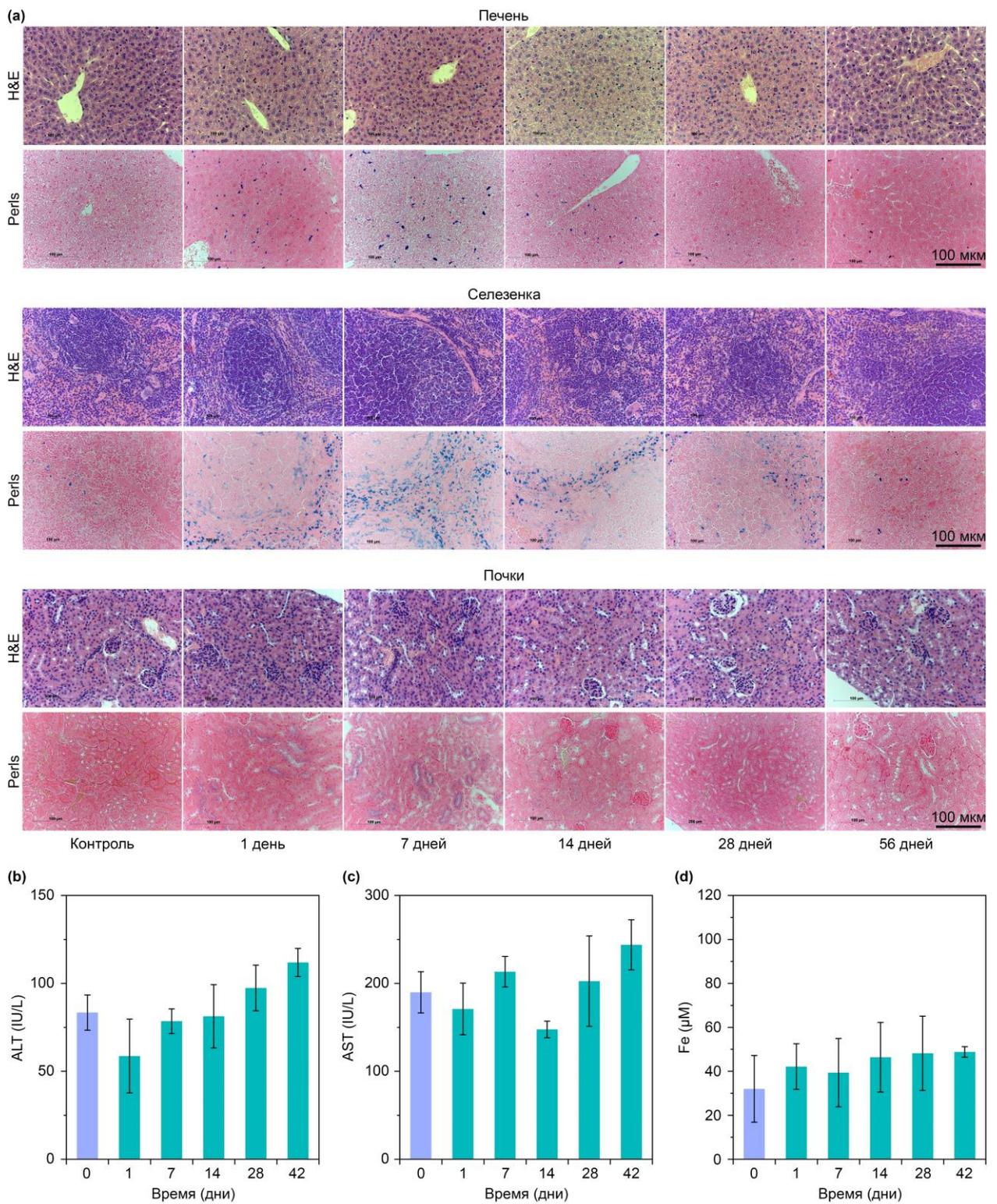


Рис. 53. Гистология и биохимия сыворотки крови. (a) Репрезентативные гистологические изображения печени, селезенки и почек в различные моменты времени после инъекции наночастиц. Точки локализации окрашены синим (окраска по Перлсу). (b-e) Биохимические показатели мышинной плазмы в различные моменты времени после инъекции наночастиц.

#### 4.7.9. Биохимический анализ крови

Для исследования органоспецифической токсичности введенных наночастиц и продуктов их разложения на протяжении всего периода их деградации был проведен биохимический анализ крови с определением параметров ALT, AST и Fe (Рис. 53).

Известно, что ALT является энзимом, который содержится в основном, в клетках печени, в меньшем количестве в почках, сердце и скелетных мышцах [173]. Поражение печеночной паренхимы способствует высвобождению упомянутого энзима в кровь. В то же время энзим AST обнаруживается в тканях с интенсивным метаболизмом (сердечная мышца, печеночные клетки, почках, поджелудочной железе и эритроцитах) [173]. Как правило при остром или хроническом повреждении тканей данные энзимы высвобождаются и приводят к повышению значений показателей в прямой зависимости от количества поврежденных клеток. Однако в данном исследовании показатели ALT и AST на протяжении всего исследования оставались в пределах нормы и были статистически не отличимы от контрольных значений. Также интересным представляются данные по показателю Fe, которые оставались на уровне контрольных значений во время всего процесса биодegradации наночастиц. Отсутствие изменения со стороны Fe может быть связано с тем, что длительная деградация МНЧ не приводит к токсичному отравлению железом. Возможно медленный релиз железа из наночастиц способствует его рациональному перераспределению, депонированию излишка в виде его биогенных форм в виде гемоглибина, ферритина и гемосидерина. Таким образом, данные биохимического анализа крови косвенно свидетельствуют о том, что длительная деградация введенных МНЧ не оказывает выраженного токсического воздействия на внутренние органы и не вызывает изменений на уровень железа в плазме крови.

## 5. Выводы

1. Предложен способ изучения циркуляции наночастиц на основе ранее предложенной перфузионной модели изолированной печени и метода MRQ, осуществляющего детекцию магнитных наночастиц. Показано, что данный способ позволяет корректно описывать сравнительную динамику выведения наночастиц различного размера, дозы и химии поверхности, а также динамику выведения НЧ в средах с различным белковым составом. В частности, в безбелковой среде или в среде с мышинным альбумином процесс захвата наночастиц макрофагами значительно замедляется в сравнении с цельной сывороткой. Также продемонстрировано, что при первом проходе наночастиц через печень скорость их выведения выше, чем при их дальнейшей циркуляции.
2. Изучены процессы взаимодействия ряда магнитных наночастиц с эритроцитами в сыворотке и безбелковом буфере. Показано, что отрицательно заряженные частицы или частицы с инертной поверхностью, например, частицы покрытые полиглюкуроновой кислотой не образуют стабильных комплексов с эритроцитами, в то время как положительно заряженные частицы, в частности, с хитозановым покрытием, способны образовывать долговременные стабильные комплексы с эритроцитами. При этом стабильность образуемых комплексов в бессывороточной среде значительно выше, чем в присутствии сыворотки.
3. Исследован потенциал технологии доставки наночастиц на поверхности эритроцитов для наночастиц с размером менее 200 нм. Показано, что положительные эффекты длительной циркуляции наночастиц, связанных с эритроцитами, и увеличение доставки к интересующему органу могут быть независимыми процессами. С помощью данного подхода продемонстрировано 120-ти кратное увеличение доставки наночастиц в легкие (40% от введенной дозы).
4. Проведено первое обширное исследование деградации наноагентов, включающее в себя наблюдение полного разложения различных по свойствам типов частиц. Показано, что увеличение размера, наличие положительного заряда, использование инертных покрытий, а также увеличение вводимой дозы замедляют разложение наночастиц в организме, в то время как наличие пор, биodeградируемые полимеры на поверхности, отрицательный поверхностный заряд и уменьшение размера приводят к ускорению биоразложения магнитных наночастиц.

5. Определена токсичность процесса биоразложения 50-нм наночастиц с покрытием из полиглюкуроноовой кислоты. Показано, что магнитные многоядерные наночастицы с размером ядра 20 нм после введения в живой организм способны почти полностью деградировать за 2 месяца. Показано, что биоразложение магнитных наночастиц может временно вызывать увеличение количества клеток Купфера в печени, количества эритроцитов в крови и увеличивать экспрессию железосодержащих белков. Однако в целом биодegradация даже больших доз наночастиц является малотоксичным процессом и не вызывает повреждения органов или отдельных тканей.

## **6. Благодарности**

Соискатель выражает глубокую благодарность своему научному руководителю Зелепукину Ивану Владимировичу за неоценимый вклад в подготовку данной диссертации. Также за помощь в проведении исследований и подготовке к защите данной диссертации автор благодарит заведующего лабораторией молекулярной иммунологии ИБХ РАН Деева Сергея Михайловича и Миркасымова Азиза Батхияровича. Автор глубоко признателен своим коллегам в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН и в лаборатории нанобиотехнологий МФТИ за помощь в проведении исследований. Кроме того, автор искренне благодарен за помощь в проведении исследований и плодотворные дискуссии своим соавторам Рынгач Алине, Печниковой Надежде Александровне, Черкасову Владимиру Рюриковичу, Соколову Илье Леонидовичу, Шевченко Константину Георгиевичу, Бабенышеву Андрею Владимировичу и Петерсен Елене Владимировне. Также автор благодарит своих родственников и друзей за поддержку во время подготовки данной диссертации и в процессе всего процесса обучения. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

## 7. Список сокращений

MPT – магнитная резонансная томография

КТ – компьютерная томография

ЛС – лекарственные средства

CR1g – С3 зависимый рецептор клеток Купфера

ICR – Imprinting Control Region

MPQ – Magnetic Particle Quantification

ЛМ – лекарственные молекулы

ЛС – лекарственное средство

НЧ – наночастицы

МЧ – магнитные частицы

СМХ – карбоксиметилдекстран

АРА – полимер глюкуроновой кислоты

PEG/P – полиэтилен гликоль  $\alpha$ - $\omega$ -дифосфат

PS – полистеринсульфонат

РАА – полиаспартатная кислота

PAS – полиакриловая кислота

Chitosan – хитозан

HMDS – гексаметилдисилазан

AUC – интеграл функции кривой выведения (area under curve)

ЦФ – центрифугирование

ICP-MS – Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (Inductively coupled plasma mass spectrometry)

SQUID – сверх- проводящее квантово-интерференционное устройство (Superconducting Quantum Interference Device)

SPION – суперпарамагнитные наночастицы из оксида железа (superparamagnetic iron oxide nanoparticles)

ID – введенная доза (injected dose)

ТЕМ – трансмиссионная электронная микроскопия

FMR – ферромагнитный резонанс

## 8. Список литературы

1. Janib S.M., Moses A.S., MacKay J.A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010. Vol. 62, № 11. P. 1052–1063.
2. Zhang Y.-N. et al. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination // *Journal of Controlled Release*. 2016.
3. Tian Q. et al. Glycyrrhetic acid-modified chitosan/poly(ethylene glycol) nanoparticles for liver-targeted delivery // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, № 17. P. 4748–4756.
4. Aggeler J. Initial events during phagocytosis by macrophages viewed from outside and inside the cell: membrane-particle interactions and clathrin // *The Journal of Cell Biology*. 1982. Vol. 94, № 3. P. 613–623.
5. Nel A.E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface // *Nature Materials*. 2009. Vol. 8, № 7. P. 543–557.
6. Owens D., Peppas N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles // *International Journal of Pharmaceutics*. 2006. Vol. 307, № 1. P. 93–102.
7. Lundqvist M. et al. The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 9. P. 7503–7509.
8. Nikitin M.P. et al. Quantitative real-time in vivo detection of magnetic nanoparticles by their nonlinear magnetization // *Journal of Applied Physics*. 2008. Vol. 103, № 7. P. 07A304.
9. Tenzer S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology // *Nature Nanotechnology*. 2013. Vol. 8, № 10. P. 772–781.
10. Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine // *Journal of Nanobiotechnology*. 2004. Vol. 2, № 1. P. 1–6.
11. De M., Ghosh P.S., Rotello V.M. Applications of Nanoparticles in Biology // *Advanced Materials*. 2008. Vol. 20, № 22. P. 4225–4241.
12. Alexis F. et al. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles // *Molecular Pharmaceutics*. 2008. Vol. 5, № 4. P. 505–515.
13. Hirn S. et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 2011. Vol. 77, № 3. P. 407–416.

14. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // *Nature Biotechnology*. 2015. Vol. 33, № 9. P. 941–951.
15. Helmchen F., Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. 2005. Vol. 2, № 12.
16. Lenaerts V. et al. In Vivo Uptake of Polyisobutyl Cyanoacrylate Nanoparticles by Rat Liver Kupffer , Endothelial , and Parenchymal Cells // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984. Vol. 73, № 7. P. 980–982.
17. Wiekhorst F. et al. Quantification of Magnetic Nanoparticles by Magnetorelaxometry and Comparison to Histology After Magnetic Drug Targeting. 2006. P. 3222–3225.
18. Kreuter J., Kaiser E., Pfluger B. Localization of colloidal particles ( liposomes , hexylcyanoacrylate nanoparticles and albumin nanoparticles ) by histology and autoradiography in mice. 1987. Vol. 39. P. 213–227.
19. Tietze R. et al. Visualization of superparamagnetic nanoparticles in vascular tissue using X I CT and histology. 2011. P. 153–158.
20. Lee J. et al. In vitro Toxicity Testing of Nanoparticles in 3D Cell Culture. 2009. P. 1213–1221.
21. Braydich-stolle L. et al. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. 2005. Vol. 88, № 2. P. 412–419.
22. Bessems M. et al. The isolated perfused rat liver : standardization of a time-honoured model. 2006. № Haussinger 1987. P. 236–246.
23. Mejer D.K.F., Swart P.J. Isolated perfused liver as a tool to study the disposition of peptides, liver first-pass effects, and cell-specific drug delivery // *Journal of Controlled Release*. 1997. Vol. 46, № 1–2. P. 139–156.
24. Lundqvist M. et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105, № 38. P. 14265–14270.
25. Hellstrand E. et al. Complete high-density lipoproteins in nanoparticle corona // *FEBS Journal*. 2009. Vol. 276, № 12. P. 3372–3381.
26. Lynch I., Salvati A., Dawson K.A. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? // *Nature Nanotechnology*. 2009. Vol. 4, № 9. P. 546–547.

27. Cedervall T. et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104, № 7. P. 2050–2055.
28. Dell’Orco D. et al. Modeling the Time Evolution of the Nanoparticle-Protein Corona in a Body Fluid // *PLoS ONE* / ed. Astier Y. 2010. Vol. 5, № 6. P. e10949.
29. Liu Z. et al. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105, № 5. P. 1410–1415.
30. Frank M.M., Fries L.F. The role of complement in inflammation and phagocytosis // *Immunology Today*. 1991. Vol. 12, № 9. P. 322–326.
31. Singer L., Cohen H.R., Wetsel R.A. Complement C3 Deficiency: Human, Animal, and Experimental Models // *Pathobiology*. 1994. Vol. 62, № 1. P. 14–28.
32. Sandvig K. et al. Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity // *Histochem. Cell Biol.* 2008. Vol. 129, № 3. P. 267–276.
33. Iversen T.-G., Skotland T., Sandvig K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies // *Nano Today*. 2011. Vol. 6, № 2. P. 176–185.
34. Knoll P. et al. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge // *Journal of Hepatology*. 1995. Vol. 22, № 2. P. 226–229.
35. Ravetch J.V., Bolland S. IGG FC RECEPTORS // *Annual Review of Immunology*. 2001. Vol. 19, № 1. P. 275–290.
36. Brown E.J. Complement receptors and phagocytosis // *Curr. Opin. Immunol.* 1991. Vol. 3, № 1. P. 76–82.
37. Helmy K.Y. et al. CR1g: A Macrophage Complement Receptor Required for Phagocytosis of Circulating Pathogens // *Cell*. 2006. Vol. 124, № 5. P. 915–927.
38. Chambers E., Mitragotri S. Prolonged circulation of large polymeric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes // *Journal of Controlled Release*. 2004. Vol. 100, № 1. P. 111–119.
39. Anselmo A.C. et al. Delivering Nanoparticles to Lungs while Avoiding Liver and Spleen through Adsorption on Red Blood Cells // *ACS Nano*. 2013. Vol. 7, № 12. P. 11129–11137.

40. Duarte M.I. et al. Haemobartonella-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology // *J. Infect. Dis.* 1992. Vol. 165, № 5. P. 976–977.
41. Murciano J.-C. et al. Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 8. P. 891–896.
42. Moghimi S.M., Davis S.S. Innovations in avoiding particle clearance from blood by Kupffer cells: cause for reflection. // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1994. Vol. 11, № 1. P. 31–59.
43. Moghimi S.M., Hunter C. Capture of Stealth Nanoparticles by the Body's Defences // *CRT.* 2001. Vol. 18, № 6.
44. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice // *Pharmacol Rev.* 2001. Vol. 53, № 2. P. 283–318.
45. Gao J., Gu H., Xu B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications // *Accounts of Chemical Research.* 2009. Vol. 42, № 8. P. 1097–1107.
46. Batlle X., Labarta A. Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties // *Journal of Physics D: Applied Physics.* 2002. Vol. 35, № 6. P. R15–R42.
47. Lu A.-H., Salabas E.L., Schüth F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application // *Angewandte Chemie International Edition.* 2007. Vol. 46, № 8. P. 1222–1244.
48. Jordan A. et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 1999. Vol. 201, № 1–3. P. 413–419.
49. Ito A. et al. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2005. Vol. 100, № 1. P. 1–11.
50. Molday R.S., MacKenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells // *J Immunol Methods.* 1982. Vol. 52.
51. Wu S. et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical coprecipitation // *Materials Letters.* 2011. Vol. 65, № 12. P. 1882–1884.
52. Orlov A.V. et al. Magnetic Immunoassay for Detection of Staphylococcal Toxins in Complex Media // *Analytical Chemistry.* 2013. Vol. 85, № 2. P. 1154–1163.

53. Gubin S.P. et al. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties // Russ. Chem. Rev. 2005. Vol. 74, № 6. P. 489–520.
54. Karaagac O., Kockar H. A simple way to obtain high saturation magnetization for superparamagnetic iron oxide nanoparticles synthesized in air atmosphere: Optimization by experimental design // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2016. Vol. 409. P. 116–123.
55. Nikitin M.P. et al. Ultrasensitive detection enabled by nonlinear magnetization of nanomagnetic labels // Nanoscale. 2018. Vol. 10, № 24. P. 11642–11650.
56. McCarthy J., Weissleder R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy☆ // Advanced Drug Delivery Reviews. 2008. Vol. 60, № 11. P. 1241–1251.
57. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy // Materials Science and Engineering: C. 2016. Vol. 60. P. 569–578.
58. Cherkasov V.R. et al. Nanoparticle Beacons: Supersensitive Smart Materials with On/Off-Switchable Affinity to Biomedical Targets // ACS Nano. 2020. Vol. 14, № 2. P. 1792–1803.
59. Caster J.M. et al. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials // WIREs Nanomed Nanobiotechnol. 2017. Vol. 9, № 1.
60. Anselmo A.C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic // Bioengineering & Translational Medicine. 2016. Vol. 1, № 1. P. 10–29.
61. Anselmo A.C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update // Bioeng Transl Med. 2019. Vol. 4, № 3.
62. Suk J.S. et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery // Advanced Drug Delivery Reviews. 2016. Vol. 99. P. 28–51.
63. Cheng L. et al. Organic Stealth Nanoparticles for Highly Effective *in Vivo* Near-Infrared Photothermal Therapy of Cancer // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 6. P. 5605–5613.
64. Butcher N.J., Mortimer G.M., Minchin R.F. Unravelling the stealth effect // Nature Nanotech. 2016. Vol. 11, № 4. P. 310–311.
65. Petriev V.M. et al. Nuclear nanomedicine using Si nanoparticles as safe and effective carriers of <sup>188</sup>Re radionuclide for cancer therapy // Sci Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 2017.

66. Abu Lila A.S., Kiwada H., Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage // *Journal of Controlled Release*. 2013. Vol. 172, № 1. P. 38–47.
67. Cho E.C., Zhang Q., Xia Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles // *Nature Nanotech.* 2011. Vol. 6, № 6. P. 385–391.
68. Hatakeyama H., Akita H., Harashima H. The Polyethyleneglycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2013. Vol. 36, № 6. P. 892–899.
69. Saha S. et al. Gold Nanoparticle Reprograms Pancreatic Tumor Microenvironment and Inhibits Tumor Growth // *ACS Nano*. 2016. Vol. 10, № 12. P. 10636–10651.
70. Wu M.-X., Yang Y.-W. Metal-Organic Framework (MOF)-Based Drug/Cargo Delivery and Cancer Therapy // *Adv. Mater.* 2017. Vol. 29, № 23. P. 1606134.
71. Zelepukin I.V. et al. Nanoparticle-based drug delivery *via* RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth // *Nanoscale*. 2019. Vol. 11, № 4. P. 1636–1646.
72. Zhao Z. et al. Erythrocyte leveraged chemotherapy (ELeCt): Nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5, № 11. P. eaax9250.
73. Gaspar R., Duncan R. Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009. Vol. 61, № 13. P. 1220–1231.
74. Sainz V. et al. Regulatory aspects on nanomedicines // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015. Vol. 468, № 3. P. 504–510.
75. Wilhelm S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // *Nat Rev Mater.* 2016. Vol. 1, № 5. P. 16014.
76. Tavares A.J. et al. Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017. Vol. 114, № 51.
77. Wang H. et al. Diagnostic imaging and therapeutic application of nanoparticles targeting the liver // *J. Mater. Chem. B*. 2015. Vol. 3, № 6. P. 939–958.
78. Leroux D. et al. Prospective evaluation of a rapid nanoparticle-based lateral flow immunoassay (STic Expert<sup>®</sup> HIT) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia // *Br J Haematol.* 2014. Vol. 166, № 5. P. 774–782.

79. Vijayakumar M.R. et al. Intravenous administration of trans-resveratrol-loaded TPGS-coated solid lipid nanoparticles for prolonged systemic circulation, passive brain targeting and improved in vitro cytotoxicity against C6 glioma cell lines // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6, № 55. P. 50336–50348.
80. Ou H. et al. Surface-adaptive zwitterionic nanoparticles for prolonged blood circulation time and enhanced cellular uptake in tumor cells // *Acta Biomaterialia.* 2018. Vol. 65. P. 339–348.
81. Knopp R., Claypool R., Leonardi D. Use of the tilt test in measuring acute blood loss // *Annals of Emergency Medicine.* 1980. Vol. 9, № 2. P. 72–75.
82. Marquet R. et al. Blood donation leads to a decrease in natural killer cell activity: a study in normal blood donors and cancer patients // *Transfusion.* 1993. Vol. 33, № 5. P. 368–373.
83. Jones S.W. et al. Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background // *J. Clin. Invest.* 2013. Vol. 123, № 7. P. 3061–3073.
84. Wei D. et al. Noninvasive monitoring of nanoparticle clearance and aggregation in blood circulation by in vivo flow cytometry // *Journal of Controlled Release.* 2018. Vol. 278. P. 66–73.
85. Zharov V.P. et al. Photoacoustic flow cytometry: principle and application for real-time detection of circulating single nanoparticles, pathogens, and contrast dyes in vivo // *J. Biomed. Opt.* 2007. Vol. 12, № 5. P. 051503.
86. Kim J.-W. et al. Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents // *Nature Nanotech.* 2009. Vol. 4, № 10. P. 688–694.
87. Gleich B., Weizenecker J. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles // *Nature.* 2005. Vol. 435, № 7046. P. 1214–1217.
88. Liu T. et al. Quantitative Evaluation of the Reticuloendothelial System Function with Dynamic MRI // *PLoS ONE* / ed. Walczak P. 2014. Vol. 9, № 8. P. e103576.
89. Próspero A.G. et al. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry // *J Nanobiotechnol.* 2017. Vol. 15, № 1. P. 22.
90. Pankhurst Q.A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003. Vol. 36, № 13. P. R167–R181.
91. Lewin M. et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells // *Nat Biotechnol.* 2000. Vol. 18, № 4. P. 410–414.

92. Dobson J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles // *Nature Nanotech.* 2008. Vol. 3, № 3. P. 139–143.
93. Huang H. et al. Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles // *Nature Nanotech.* 2010. Vol. 5, № 8. P. 602–606.
94. Tay A., Di Carlo D. Magnetic Nanoparticle-Based Mechanical Stimulation for Restoration of Mechano-Sensitive Ion Channel Equilibrium in Neural Networks // *Nano Lett.* 2017. Vol. 17, № 2. P. 886–892.
95. Rao S. et al. Remotely controlled chemomagnetic modulation of targeted neural circuits // *Nat. Nanotechnol.* 2019. Vol. 14, № 10. P. 967–973.
96. McCormack P.L. Ferumoxytol: In Iron Deficiency Anaemia in Adults With Chronic Kidney Disease // *Drugs.* 2012. Vol. 72, № 15. P. 2013–2022.
97. Levy M. et al. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, № 16. P. 3988–3999.
98. Fang J.H. et al. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage // *BMC Neurosci.* 2010. Vol. 11. P. 31.
99. Zelepukin I.V. et al. Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study // *Journal of Controlled Release.* 2020. Vol. 326. P. 181–191.
100. Ke P.C. et al. A Decade of the Protein Corona // *ACS Nano.* 2017. Vol. 11, № 12. P. 11773–11776.
101. Quini C.C. et al. Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2017. Vol. 13, № 4. P. 1519–1529.
102. Gutiérrez L. et al. Degradation of magnetic nanoparticles mimicking lysosomal conditions followed by AC susceptibility // *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik.* 2015. Vol. 60, № 5.
103. Rabel M. et al. Simulation of the long-term fate of superparamagnetic iron oxide-based nanoparticles using simulated biological fluids // *Nanomedicine.* 2019. Vol. 14, № 13. P. 1681–1706.
104. Rojas J.M. et al. Time-course assessment of the aggregation and metabolization of magnetic nanoparticles // *Acta Biomaterialia.* 2017. Vol. 58. P. 181–195.

105. Mazuel F. et al. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels // *ACS Nano*. 2016. Vol. 10, № 8. P. 7627–7638.
106. Ruiz A. et al. Biotransformation of magnetic nanoparticles as a function of coating in a rat model // *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, № 39. P. 16321–16329.
107. Van de Walle A. et al. Biosynthesis of magnetic nanoparticles from nano-degradation products revealed in human stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. Vol. 116, № 10. P. 4044–4053.
108. Kolosnjaj-Tabi J. et al. Biotransformations of magnetic nanoparticles in the body // *Nano Today*. 2016. Vol. 11, № 3. P. 280–284.
109. Stepien G. et al. Effect of Surface Chemistry and Associated Protein Corona on the Long-Term Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles In Vivo // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. Vol. 10, № 5. P. 4548–4560.
110. Kolosnjaj-Tabi J. et al. The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice // *ACS Nano*. 2015. Vol. 9, № 8. P. 7925–7939.
111. Thirion C., Wernsdorfer W., Maily D. Switching of magnetization by nonlinear resonance studied in single nanoparticles // *Nature Mater.* 2003. Vol. 2, № 8. P. 524–527.
112. Chertok B. et al. Comparison of Electron Spin Resonance Spectroscopy and Inductively-Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy for Biodistribution Analysis of Iron-Oxide Nanoparticles // *Mol. Pharmaceutics*. 2010. Vol. 7, № 2. P. 375–385.
113. Gamarra L. Ferromagnetic resonance for the quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological materials // *IJN*. 2010. P. 203.
114. Wu Y. et al. Core size determination and structural characterization of intravenous iron complexes by cryogenic transmission electron microscopy // *International Journal of Pharmaceutics*. 2016. Vol. 505, № 1–2. P. 167–174.
115. Kuznetsova O.V. et al. High-resolution ICP-MS approach for characterization of magnetic nanoparticles for biomedical applications // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020. Vol. 189. P. 113479.
116. MacParland S.A. et al. Phenotype Determines Nanoparticle Uptake by Human Macrophages from Liver and Blood // *ACS Nano*. 2017. Vol. 11, № 3. P. 2428–2443.

117. López-Castro J.D. et al. From synthetic to natural nanoparticles: monitoring the biodegradation of SPIO (P904) into ferritin by electron microscopy // *Nanoscale*. 2011. Vol. 3, № 11. P. 4597.
118. Valero E. et al. In Vivo Long-Term Magnetic Resonance Imaging Activity of Ferritin-Based Magnetic Nanoparticles versus a Standard Contrast Agent // *J. Med. Chem.* 2014. Vol. 57, № 13. P. 5686–5692.
119. Arami H. et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol. 44, № 23. P. 8576–8607.
120. Kolosnjaj-Tabi J. et al. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment // *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, № 5. P. 4268–4283.
121. Anselmo A.C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update post COVID -19 vaccines // *Bioeng Transl Med*. 2021. Vol. 6, № 3.
122. Weissleder R. et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. // *Radiology*. 1990. Vol. 175, № 2. P. 494–498.
123. Gazelle G.S. et al. US, CT, and MRI of Primary and Secondary Liver Lymphoma: // *Journal of Computer Assisted Tomography*. 1994. Vol. 18, № 3. P. 412–415.
124. Zelepukin I.V. et al. Long-Term Fate of Magnetic Particles in Mice: A Comprehensive Study // *ACS Nano*. 2021. Vol. 15, № 7. P. 11341–11357.
125. Van de Walle A. et al. Ever-Evolving Identity of Magnetic Nanoparticles within Human Cells: The Interplay of Endosomal Confinement, Degradation, Storage, and Neocrystallization // *Acc. Chem. Res.* 2020. Vol. 53, № 10. P. 2212–2224.
126. Monopoli M.P. et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials // *Nature Nanotech.* 2012. Vol. 7, № 12. P. 779–786.
127. Fadeel B. et al. Bridge over troubled waters: understanding the synthetic and biological identities of engineered nanomaterials: Bridging nanotoxicology and nanomedicine // *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2013. Vol. 5, № 2. P. 111–129.
128. Volatron J. et al. Ferritin Protein Regulates the Degradation of Iron Oxide Nanoparticles // *Small*. 2017. Vol. 13, № 2. P. 1602030.

129. Briley-Saebo K. et al. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging // *Cell and Tissue Research*. 2004. Vol. 316, № 3. P. 315–323.
130. Mackenzie E.L., Iwasaki K., Tsuji Y. Intracellular Iron Transport and Storage: From Molecular Mechanisms to Health Implications // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008. Vol. 10, № 6. P. 997–1030.
131. Krystek P. A review on approaches to bio distribution studies about gold and silver engineered nanoparticles by inductively coupled plasma mass spectrometry // *Microchemical Journal*. 2012. Vol. 105. P. 39–43.
132. Shipunova V.O. et al. MPQ-Cytometry: a Magnetism-Based Method for Quantification of Nanoparticle-Cell Interactions: JOUR // *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 8. P. 12764–12772.
133. Orlov A.V. et al. Multiplex Biosensing Based on Highly Sensitive Magnetic Nanolabel Quantification: Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins A, B, and E in Liquids // *Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 88, № 21. P. 10419–10426.
134. Orlov A.V. et al. Rapid dry-reagent immunomagnetic biosensing platform based on volumetric detection of nanoparticles on 3D structures // *Biosensors and Bioelectronics*. 2016. Vol. 79. P. 423–429.
135. Gage G.J., Kipke D.R., Shain W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents // *Journal of Visualized Experiments*. 2012. № 65.
136. Assimacopoulos Jeannet F., Exton J.H., Jeanrenaud B. Control of gluconeogenesis and glycogenolysis in perfused livers of normal mice // *American Journal of Physiology*. 1973. Vol. 225, № 1. P. 25–32.
137. Olschewski P. et al. The influence of storage temperature during machine perfusion on preservation quality of marginal donor livers // *Cryobiology*. Elsevier Inc., 2010. Vol. 60, № 3. P. 337–343.
138. Perkins J.D. Correlation Between the Liver Temperature Employed During Machine Perfusion and Reperfusion Damage: Role of Ca<sup>2+</sup> // *Liver Transplantation*. 2007. Vol. 13, № 3. P. 465–466.
139. Карташев Н.Н., Соколов В.Е., Шилов И.А. Практикум по зоологии позвоночных. Высшая школа. Москва, 1981. 320 p.

140. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей). СОТИС. СПб., 2007. 520 p.
141. Abel В.Е.А. S. Nanoparticle Technology for Delivery of Drugs Across the Blood – Brain. 1998. Vol. 87, № 11. P. 1305–1307.
142. Yoo J., Chambers E., Mitragotri S. Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood : Challenges , Solutions and Future Prospects. 2010. P. 2298–2307.
143. Murray I.M. THE MECHANISM OF BLOCKADE OF THE RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM // Journal of Experimental Medicine. 1963. Vol. 117, № 1. P. 139–147.
144. Liu T. et al. RES blockade: A strategy for boosting efficiency of nanoparticle drug // Nano Today. 2015. Vol. 10, № 1. P. 11–21.
145. Nikitin P.I., Vetoshko P.M., Ksenevich T.I. New type of biosensor based on magnetic nanoparticle detection // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2007. Vol. 311, № 1. P. 445–449.
146. Orlov A.V. et al. Rapid dry-reagent immunomagnetic biosensing platform based on volumetric detection of nanoparticles on 3D structures // Biosensors and Bioelectronics. 2016. Vol. 79. P. 423–429.
147. Boutry S. et al. How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note // Contrast Media Mol Imaging. 2009. Vol. 4, № 6. P. 299–304.
148. Jain T.K. et al. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats // Mol. Pharmaceutics. 2008. Vol. 5, № 2. P. 316–327.
149. Arbab A.S. et al. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging // NMR Biomed. 2005. Vol. 18, № 6. P. 383–389.
150. Lévy M. et al. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties // Nanotechnology. 2010. Vol. 21, № 39. P. 395103.
151. Gustafson H.H. et al. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem // Nano Today. 2015. Vol. 10, № 4. P. 487–510.
152. Tsoi K.M. et al. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver // Nature Mater. 2016. Vol. 15, № 11. P. 1212–1221.

153. Zhang Y.-N. et al. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination // *Journal of Controlled Release*. 2016. Vol. 240. P. 332–348.
154. Theurl I. et al. Pathways for the regulation of body iron homeostasis in response to experimental iron overload // *Journal of Hepatology*. 2005. Vol. 43, № 4. P. 711–719.
155. Freeman E.C., Weiland L.M., Meng W.S. Modeling the proton sponge hypothesis: examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2013. Vol. 24, № 4. P. 398–416.
156. Lale S.V. et al. Multifunctional ATRP based pH responsive polymeric nanoparticles for improved doxorubicin chemotherapy in breast cancer by proton sponge effect/endolysosomal escape // *Polym. Chem.* 2015. Vol. 6, № 11. P. 2115–2132.
157. Varkouhi A.K. et al. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals // *Journal of Controlled Release*. 2011. Vol. 151, № 3. P. 220–228.
158. Martens T.F. et al. Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act // *Nano Today*. 2014. Vol. 9, № 3. P. 344–364.
159. Ho B.T., Roberts T.K., Lucas S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018. Vol. 38, № 2. P. 308–320.
160. Croissant J.G., Fatieiev Y., Khashab N.M. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles // *Adv. Mater.* 2017. Vol. 29, № 9. P. 1604634.
161. Maldiney T. et al. Effect of Core Diameter, Surface Coating, and PEG Chain Length on the Biodistribution of Persistent Luminescence Nanoparticles in Mice // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 2. P. 854–862.
162. Moore T.L. et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol. 44, № 17. P. 6287–6305.
163. Sawicki M., Stefanowicz W., Ney A. Sensitive SQUID magnetometry for studying nanomagnetism // *Semicond. Sci. Technol.* 2011. Vol. 26, № 6. P. 064006.

164. Gabbasov R. et al. Biodegradation of Magnetic Nanoparticles in Mouse Liver From Combined Analysis of Mössbauer and Magnetization Data // *IEEE Trans. Magn.* 2013. Vol. 49, № 1. P. 394–397.
165. Mejías R. et al. Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications // *Journal of Controlled Release.* 2013. Vol. 171, № 2. P. 225–233.
166. Ouyang B. et al. The dose threshold for nanoparticle tumour delivery // *Nat. Mater.* 2020. Vol. 19, № 12. P. 1362–1371.
167. Zelepukin I.V. et al. Magnetometry based method for investigation of nanoparticle clearance from circulation in a liver perfusion model // *Nanotechnology.* 2019. Vol. 30, № 10. P. 105101.
168. Knutson M.D. Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis // *Journal of Biological Chemistry.* 2017. Vol. 292, № 31. P. 12735–12743.
169. *Unraveling the Safety Profile of Nanoscale Particles and Materials - From Biomedical to Environmental Applications* / ed. Gomes A.C., Sarria M.P. InTech, 2018.
170. Kolnagou A. et al. The importance of spleen, spleen iron, and splenectomy for determining total body iron load, ferrit kinetics, and iron toxicity in thalassemia major patients // *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2013. Vol. 23, № 1. P. 34–41.
171. Shafie E. et al. The effects of nanoparticles containing iron on blood and inflammatory markers in comparison to ferrous sulfate in anemic rats // *Int J Prev Med.* 2016. Vol. 7, № 1. P. 117.
172. Santos E.W. et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice // *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2016. Vol. 53, № 2. P. 138.
173. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.* Elsevier, 2012.