

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИМЕНИ В.А. АЛМАЗОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

*На правах рукописи*

**ТОРОПОВА Яна Геннадьевна**

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ  
МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА И  
ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАНОСТИКЕ**

14.03.03 – патологическая физиология  
(3.3.3 - патологическая физиология)

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени доктора  
биологических наук

Научные консультанты:

Член-корр. РАН, д.м.н. М.М. Галагудза

д.м.н. А.Я. Багров

Санкт-Петербург - 2022

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1 - ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	20
1.1 - Магнитные наночастицы оксида железа в биомедицине .....	20
1.1.1 - Магнитные наночастицы оксида железа как диагностические агенты .....	22
1.1.2 - Магнитные наночастицы оксида железа как гипертермические агенты.....	23
1.2 - Подходы к модификации поверхности магнитных наночастиц оксида железа с помощью покрытия оболочками .....	26
1.3 - Механизмы токсичности магнитных наночастиц оксида железа.....	31
1.4 - Патофизиологические основы направленной доставки химиотерапевтических препаратов.....	40
1.4.1 - Пассивная направленная доставка химиотерапевтических препаратов .....	41
1.4.2 - Активная направленная доставка химиотерапевтических препаратов .....	47
1.5 - Концепция магнитоуправляемой доставки химиотерапевтических препаратов .....	50
1.6 - Заключение по обзору литературы .....	53
ГЛАВА 2 - МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
2.1 - Используемые в работе объекты исследования .....	56
2.1.1 - Синтез немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа .....	56
Синтез наночастиц магнетита.....	60

Синтез композитных наночастиц на основе оксида железа и диоксида кремния .....	61
Синтез композитных наночастиц оксида железа с оболочкой из диоксида кремния .....	61
Синтез композитных наночастиц оксида железа с ядром из диоксида кремния .....	62
2.1.2 - Синтез наночастиц магнетита с модифицированной поверхностью .....	63
Синтез наночастиц магнетита с оболочкой на основе полилактида (-D, L).....	64
Синтез наночастиц магнетита с оболочкой из полисахаридов .....	64
Синтез наночастиц магнетита с оболочкой из альбумина.....	65
Синтез наночастиц магнетита с оболочкой на основе полилактида с включенным в состав оболочки флуоресцентным агентом-индоцианином зеленым .....	65
2.2 - Определение физико-химических характеристик наночастиц оксида железа.....	66
2.3 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на морфологию и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека (культура HUVEC).....	67
Культивирование эндотелиальных клеток человека с магнитными наночастицами оксида железа.....	68
Визуальный контроль морфологических изменений клеток эндотелиальных клеток человека в условиях культивирования с магнитными наночастицами оксида железа .....	68

Определение размера и гранулярности клеток эндотелиальных клеток человека в условиях культивирования с магнитными наночастицами оксида железа .....	69
2.4 - Количественная оценка показателей периферической крови крыс при однократном внутривенном введении магнитных наночастиц оксида железа .....	69
2.5 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз и агрегацию эритроцитов и продукцию активных форм кислорода .....	71
Оценка генерации активных форм кислорода .....	72
Исследование спонтанной агрегации эритроцитов цельной крови .....	72
Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на спонтанный гемолиз .....	72
Определение качественного состава белкового слоя .....	73
2.6 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на сократительную и релаксационную функции артерий .....	74
2.7 - Исследование влияния внутривенного введения магнитных наночастиц оксида железа на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока .....	76
2.8 - Исследование органного распределения магнитных наночастиц оксида железа .....	80
2.9 - Исследование системных эффектов однократного и многократного внутривенного введения крысам магнитных наночастиц оксида железа .....	82
2.10 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях <i>in vivo</i> при наличии внешнего магнитного поля .....	88

2.11 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях <i>ex vivo</i> при наличии внешнего магнитного поля.....	91
2.12 - Исследование морфофункционального состояния сосудов в условиях однократного внутривенного введения крысам модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа.....	96
2.13 - Исследование патофизиологических эффектов модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа при их однократном внутривенном введении крысам .....	98
2.14 - Исследование влияния наночастиц оксида железа с различным качественным составом оболочек на генерацию активных форм кислорода в динамике инкубации с кровью человека.....	100
2.15 - Экспериментальное обоснование возможности использования магнитных наночастиц оксида железа для их магнитоуправляемой доставки в ткань (стендовые условия, <i>ex vivo</i> ).....	103
2.16 - Экспериментальное подтверждение возможности использования магнитных наночастиц оксида железа для их магнитоуправляемой доставки в опухолевую ткань ( <i>in vivo</i> ).....	106
2.17 - Статистическая обработка результатов.....	109
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ГЛАВЫ 2 .....	109
ГЛАВА 3 - ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НЕМОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА .....	111
3.1 - Физико-химические свойства немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава .....	112
3.2 - Морфология и жизнеспособность эндотелиоцитов человека и показатели периферической крови крыс в условиях воздействия	

немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава .....	115
3.3 - Исследование влияния немодифицированных наночастиц оксида железа в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз и агрегацию эритроцитов и продукцию активных форм кислорода .....	122
3.4 - Сократительная и релаксационная функции артерий в условиях введения крысам немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа .....	132
3.5 - Влияние внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока .....	135
3.5.1 - Вазомоторные реакции сосудов после окончания эксперимента с изменением скорости кровотока .....	137
3.6 - Органное распределение немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава при их внутривенном введении крысам .....	141
3.7 - Системные эффекты однократного и многократного внутривенного введения крысам немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава .....	144
3.8 - Гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> при наличии внешнего магнитного поля .....	191
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 3-Й ГЛАВЫ .....	205
ГЛАВА 4 – ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПОЛИМЕРНЫМИ ОБОЛОЧКАМИ .....	208
4.1 - Физико-химические свойства магнитных наночастиц магнетита с различными оболочками .....	208

4.2 - Влияние однократного внутривенного введения крысам модифицированных различными органическими полимерными оболочками магнитных наночастиц оксида железа на морфофункциональное состояние сосудов .....	209
4.3 - Исследование патофизиологических эффектов модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа при их однократном внутривенном введении крысам .....	213
4.4 - Влияние модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа на генерацию активных форм кислорода при инкубации с кровью человека .....	231
4.5 - Влияние магнитных наночастиц оксида железа, покрытых оболочкой из полилактида, на генерацию активных форм кислорода в условиях индуцированного окислительного стресса .....	234
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 4-Й ГЛАВЫ .....	239
ГЛАВА 5 - ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ КОНЦЕПЦИИ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМОЙ ДОСТАВКИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (СТЕНДОВЫЕ УСЛОВИЯ, EX VIVO, IN VIVO).....	241
5.1 - Экспериментальное подтверждение концепции магнитоуправляемой доставки магнитных наночастиц оксида железа (стендовые условия, ex vivo, in vivo).....	241
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 5-Й ГЛАВЫ .....	252
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	253
ВЫВОДЫ.....	262
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	264
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	265

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АБАП	- 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид)
АД	- артериальное давление
АЛТ	- аланинаминотрансфераза
АСТ	- аспартатаминотрансфераза
АОА	- общая антиоксидатная активность
АОЕ	- антиоксидантная емкость
АХ	- ацетилхолин
АФК	- активные формы кислорода
АЧТВ	- активированное частичное тромбопластиновое время
ГХН	- гипохлорит натрия
ДРЛЖ	- давление, развиваемое левым желудочком
ИАЭ	- индекс агрегации эритроцитов
ИФА	- иммуноферментный анализ
КГ	- коэффициент гемолиза
КДД	- конечное диастолическое давление
КП	- коронарный проток
К-Х	- раствор Кребса-Хензеляйта
МНЧ	- магнитные наночастицы
МНЧ+альбумин	- наночастицы с оболочкой из альбумина
МНЧ+полилактид	- наночастицы с оболочкой из полилактида
МНЧ+полисахарид	- наночастицы с оболочкой из полисахарида
ПТ	- протромбиновое время
САД	- среднее артериальное давление
ССЗ	- сердечно-сосудистые заболевания
ТТ	- тромбиновое время
ТЭОС	- тетраэтилортосиликат
ФР	- физиологический раствор
ФЭ	- фенилэфрин



ХЛ	- хемилюминесценция
ЧСС	- частота сердечных сокращений
ЩФ	- щелочная фосфатаза
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
DMSO	- диметилсульфоксид
H <sub>2</sub> O <sub>дист</sub>	- дистиллированная вода
HUVES	- эндотелиальные клетки пупочной вены человека
IL-1 $\beta$	- интерлейкин 1-бета
MCP1	- моноцитарный хемоаттрактантный белок-1
NO	- оксид азота
PLA	- полилактид

## ВВЕДЕНИЕ

Применение наноматериалов для решения различных биомедицинских задач (диагностика, лечение различных заболеваний) на сегодняшний день является одним из приоритетных научных направлений. Особый интерес в широком спектре наночастиц, предполагаемых для использования в биомедицине, представляют магнитные наночастицы (наноразмерные частицы оксида железа, МНЧ), что обусловлено их уникальными химическими, биологическими и магнитными характеристиками, обеспечивающими их многофункциональность. Так, МНЧ могут быть сконцентрированы в определенном участке с помощью применения магнитного поля, обеспечивая тем самым целевую доставку фармакологических агентов. Кроме того, МНЧ могут быть использованы в качестве теплогенерирующих систем для гипертермического воздействия на опухоль – магнитной гипертермии, а также существует возможность их использования в качестве контрастирующего агента при магнитно-резонансной томографии [61, 130, 196, 358]. Данный вид наночастиц является перспективным агентом в рамках концепции тераностики, подразумевающей сочетание мультимодальной визуализации и комбинированных терапевтических подходов [225]. Концепция адресной доставки базируется на химической иммобилизации на поверхности наночастиц лекарственных препаратов или включении их в состав оболочки, покрывающей наночастицу. При этом адресная доставка наночастиц может осуществляться с помощью механизмов их пассивного (основанного на структурных изменениях тканей и особенностей сосудистой сети в очаге патологического процесса) и активного (включающего условия для управления перемещением в организме наноносителя) транспорта.

На сегодняшний день отдельные разработки в сфере биомедицинского применения магнитных наночастиц на основе оксида железа находятся на различных стадиях клинических испытаний [148]. При этом лишь единичные

лекарственные формы на основе наночастиц оксида железа используются для клинического применения [165, 190, 359]. На сегодняшний день не сформировано однозначного представления о механизмах, лежащих в основе взаимодействия МНЧ с биологическими объектами различного уровня (клетками, тканями, организма в целом) [337]. При этом понимание характера данного взаимодействия осложняется как разнообразием характеристик самих наночастиц, так и различным воздействием на организм наночастиц одинакового качественного состава, полученных различными способами [76, 161].

С учетом вышеобозначенных свойств магнитных наночастиц, их применение может быть наиболее востребованно в области онкологии [318]. У подавляющего большинства пациентов (85-90%) к началу лечения выявляется значительная распространенность опухоли, что обуславливает необходимость проведения химиотерапии (ХТ) как в комплексе с хирургическими методами, так и в форме самостоятельного вида лечения. Однако применения цитостатических препаратов для лечения злокачественных новообразований характеризуется высокой частотой побочных и токсических реакций [12], связанных с неспецифичностью цитостатиков, то есть их воздействием на общие с опухолью мишени в организме больного (клетки костного мозга, слизистые и т. д.) и оказанием значительного повреждающего действия на здоровые клетки. Терапевтические дозы химиопрепаратов как правило близки к максимально переносимой дозе у пациента, в которой не всегда способны оказывать достаточный по выраженности цитостатический эффект. При этом увеличение дозы цитостатиков для обеспечения необходимого по выраженности противоопухолевого эффекта сопряжено с усилением токсических эффектов, что ограничивает дальнейшее проведение ХТ в терапевтически эффективных концентрациях.

Несмотря на достигнутый в последнее время значительный прогресс в разработке альтернативных методов лечения опухолевых заболеваний,

включающих целый ряд воздействий - генную терапию, иммунотерапию, фототерапию и т.д. [149, 204, 233], ХТ остается одним из основных методов лечения злокачественных новообразований. При этом остается актуальным разработка способов снижения системной токсичности цитостатиков. Одним из перспективных подходов, направленных на решение проблемы их токсичности, является методика направленного (адресного) транспорта препаратов, основанная на их локальном накоплении в опухолевой ткани без повышения концентрации в здоровых органах и тканях. Тем самым достигается одновременное повышение концентрации препарата в целевом участке (а, следовательно, и повышение терапевтической эффективности) и нивелирование его системной токсичности. В случае использования магнитных наночастиц, перспективным представляется сочетание их эффекта в рамках многофункциональной технологии, включающей магнитные наночастицы, ассоциированные с цитостатическим препаратом (выступающие в качестве его носителя) и средство управления их перемещением в организме (источник внешнего магнитного поля или имплантанты, помещаемые в организм). Использование при этом способности наночастиц к локальному нагреву позволит существенно повысить эффективность лечения за счет обеспечения термической деструкции опухоли [312]. Также существует возможность управления дозированием препаратов за счет использования оболочки, обладающей заданными свойствами в части ее деградации с обеспечением при этом контролируемого высвобождения цитостатика [240].

В рамках разработки МНЧ для биомедицинского применения такая ситуация диктует необходимость проведения работ, направленных на детальное исследование механизмов, лежащих в основе взаимодействия конкретных видов МНЧ с клетками, отдельными органами и системами, а также исследование их биологических и токсических эффектов на уровне целого организма с сопоставлением их свойств как с материаловедческой, так и с биомедицинской стороны. При этом необходимо учитывать режим и

способ планируемого клинического применения разрабатываемых МНЧ. Наночастицы как средства адресной доставки лекарств предполагают преимущественно парентеральный путь их введения (минуя желудочно-кишечный тракт), при этом наиболее часто используется внутрисосудистый способ введения наночастиц в организм. В случае предполагаемого внутрисосудистого введения МНЧ необходимо всесторонне исследовать на уровне *in vitro* механизмы их взаимодействия с системой крови, а также их влияние на функциональную активность эндотелия. Формированию наиболее полного представления о последствиях применения МНЧ, эффектах, сопровождающих различные режимы их введения в организм и влиянии при этом на отдельные органы и системы, будет способствовать информация о системном влиянии МНЧ на уровне целого организма, наличие эффектов в отношении органов-мишеней, дозозависимость, а также взаимосвязь с характеристиками самих наночастиц. Кроме того, с позиции использования МНЧ для обеспечения магнитоуправляемого транспорта лекарств необходимо дополнение в виде определения возможности управления целевым накоплением МНЧ участке патологического процесса помощью внешнего магнитного поля.

**Цель исследования:** исследовать патофизиологические механизмы действия немодифицированных и модифицированных органическими полимерными оболочками магнитных наночастиц оксида железа при различных режимах их внутрисосудистого введения, а также экспериментально обосновать возможность использования данных видов наночастиц для магнитоуправляемой доставки лекарств в ткани.

**Задачи исследования:**

1. Провести первичный скрининг биосовместимости немодифицированных наночастиц оксида железа различного качественного состава по их влиянию на эндотелиоциты человека и показатели периферической крови крыс.

2. Исследовать гемосовместимость немодифицированных наночастиц оксида железа в динамике их взаимодействия с кровью человека.

3. Охарактеризовать органотропность немодифицированных наночастиц оксида железа различного состава и системные эффекты их однократного и многократного внутривенного введения крысам.

4. Исследовать влияние внутривенного введения крысам немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава на сократительную и релаксационную функции артерий в интактных условиях, а также их влияние на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока.

5. Проанализировать влияние немодифицированных наночастиц оксида железа различного состава на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях *in vivo* и *ex vivo* при наличии внешнего магнитного поля.

6. Исследовать патофизиологические эффекты модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа при их однократном внутривенном введении крысам.

7. Проанализировать влияние наночастиц оксида железа с различным качественным составом оболочек на генерацию активных форм кислорода в динамике инкубации с кровью человека в различных условиях.

8. Исследовать влияние внутривенного введения модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа на морфофункциональное состояние сосудов, сократительную и релаксационную функции артерий.

9. Экспериментально доказать возможность магнитоуправляемой доставки обладающих наилучшим профилем биосовместимости немодифицированных и модифицированных магнитных наночастиц оксида железа в ткань.

**Новизна исследования.** Получены новые данные о влиянии

немодифицированных и модифицированных различными органическими оболочками наночастиц оксида железа на эндотелий в экспериментальных протоколах *in vitro* и *ex vivo*. Впервые определено, что внутривенное введение наночастиц магнетита снижает способность артерий брыжейки к сокращению в интактных условиях и повышает - в условиях изменяющейся скорости кровотока.

Впервые обнаружена способность наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида снижать уровень активных форм кислорода (АФК) в интактных условиях, а также в условиях окислительного стресса.

Впервые подтверждено прохождение наночастиц магнетита через стенку изолированного сосуда крысы и их селективное накопление в участке воздействия магнитным полем в стендовых условиях, а также в условиях *ex vivo* на оригинальном гидродинамическом стенде, разработанном в Институте экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» Минздрава России в рамках экспериментального обоснования концепции магнитоуправляемой доставки с помощью магнитных наночастиц оксида железа.

В результате проведенного комплексного исследования выяснено, что наночастицы магнетита по сравнению с композитными наночастицами обладают наименьшим повреждающим действием на эндотелий и на систему крови, а также обеспечивают наименьшие токсические системные эффекты при многократном внутривенном введении.

Определены наиболее перспективные варианты для разработки новых технологий адресной доставки лекарств – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида и наночастицы с оболочкой из альбумина на основании проведенных исследований, посвященных сравнительной оценке влияния модифицированных оболочками наночастиц магнетита на морфофункциональное состояние сосудов, на генерацию активных форм кислорода (АФК) клетками крови человека, а также оценке их системных эффектов при внутривенном введении крысам.

Впервые подтверждена пассивная и магнитоуправляемая доставка в опухоль наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида при их внутривенном введении мышам.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Получены новые данные фундаментального характера, раскрывающие физиологические и патофизиологические аспекты взаимодействия магнитных наночастиц оксида железа, обладающих различными физико-химическими характеристиками (качественный состав, оболочка, размер, дзета-потенциал), с клетками, органами и системами организма.

Полученные результаты позволяют расширить и систематизировать имеющиеся сведения о взаимодействиях магнитных наночастиц оксида железа с биологическими объектами различного уровня (клеточный, органный, организменный).

Исследованные патофизиологические эффекты немодифицированных наночастиц представляют собой базовую составляющую для дальнейшего их использования при разработке способов адресной доставки лекарств, предназначенных для лечения различных патологий (новообразования, сердечно-сосудистая патология и т.д.) с помощью магнитных наночастиц на основе оксида железа с их внутривенным введением.

Сформированное представление о системных эффектах модифицированных наночастиц, а также подтверждение их накопления в опухоли под действием магнитного поля может явиться основой для разработки многофункциональной технологии магнитоуправляемой доставки цитостатиков, предусматривающей возможность одновременного сочетания различных свойств магнитных наночастиц, а именно способности к нагреву, возможности визуализации опухоли и связывания препарата с его таргетной доставкой.

При этом для управления перемещением в организме наноразмерных носителей лекарств могут быть использованы не только источники внешнего магнитного поля, но и помещенные в организм импланты с магнитными



элементами или хирургические стенты, широко используемые в разнообразных подходах для лечения сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [345].

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Немодифицированные магнитные наночастицы оксида железа различного качественного состава оказывают многообразные повреждающие эффекты на системном, органном и клеточном уровнях, выраженность которых зависит от качественного состава наночастиц, природы органической полимерной оболочки, используемых доз и длительности воздействия; наименьшее повреждающее действие оказывают наночастицы магнетита.

2. По степени влияния наночастиц на функциональную активность сосудов, уровень активных форм кислорода, а также органотоксичности модифицированные наночастицы оксида железа с оболочкой из полилактида и альбумина обладают наилучшим профилем биосовместимости.

3. Воздействие внешним магнитным полем позволяет обеспечить прохождение немодифицированных наночастиц магнетита через стенку интактного изолированного сосуда, что подтверждает возможность использования данного вида наночастиц для магнитоуправляемого транспорта лекарств.

4. Воздействие магнитным полем, создаваемым имплантированным вблизи участка локализации опухолевого процесса магнитом, позволяет при внутривенном введении крысам наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида снизить их накопление в печени и увеличить накопление в опухоли, что подтверждает возможность использования данного вида наночастиц оксида железа для магнитоуправляемой доставки цитостатиков в опухолевую ткань.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Полученные результаты внедрены в учебный процесс кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ФГБОУ ВО Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени И.П. Павлова

Минздрава России и кафедры патологической физиологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» Минздрава России для разработки учебных пособий, курсов лекций, практикумов для студентов, слушателей циклов повышения квалификации. Значимость полученных результатов подтверждается также разработанным гидродинамическим стендом для исследования проницаемости стенок сосудов для магнитных наночастиц под воздействием внешнего магнитного поля (Патент РФ №2018132156 от 07.09.2018).

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечивается большим объемом экспериментального материала в различных экспериментальных протоколах, набором современных методов, использованием высокотехнологичного оборудования и корректных подходов к статистической обработке.

**Публикации.** По результатам диссертационного исследования опубликовано 29 работ, в том числе 17 статей в изданиях, рецензируемых ВАК, и входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus, 1 патент, а также 2 главы в коллективных монографиях.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на международной конференции Future Physiology-2021 (онлайн, 2021), Алмазовском молодежном медицинском форуме (г. Санкт-Петербург, 2019 и 2020 гг.), Четвёртом междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике (Новый свет, Крым, 2018), XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017» (Санкт-Петербург, 2017), III международной школе и конференции оптоэлектроники, фотоники, инженерии и наноструктур “Saint Petersburg OPEN 2016” (Санкт-Петербург, 2016), IV международной школе и конференции оптоэлектроники, фотоники, инженерии и наноструктур “Saint Petersburg OPEN 2017” (Санкт-Петербург, 2017), XXII всероссийской конференции Молодых учёных с международным участием — актуальные

проблемы патофизиологии-2016 (Санкт-Петербург, 2016), XIV Международной конференции Мессбауэровская спектроскопия и ее применения (Казань, 2016), IV международной научной конференции «Современные медицинские исследования» (Кемерово, 2016).

**Личный вклад автора** состоит в выборе направления и организации исследования, разработке экспериментальных протоколов, а также непосредственном участии на всех этапах получения результатов, анализа экспериментальных данных, подготовки публикаций. Синтез МНЧ и анализ их физико-химических характеристик проведен совместно с заведующим НИЛ нанотехнологий ИЭМ Центра Алмазова Королевым Д.В., заведующим химико-аналитическим НИО ИЭМ Центра Алмазова Скориком Ю.А., доцентом кафедры микро- и наноэлектроники СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина) Гареевым К.Г. Соискатель выражает коллегам глубокую признательность, а также благодарит сотрудников НИЛ биопротезирования и кардиопротекции ИЭМ Центра Алмазова за активное участие в проведении исследования.

**Структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций. Диссертация изложена на 304 страницах машинописного текста. Диссертация содержит 41 таблицу, 77 рисунков. Указатель литературы включает 359 источников, из которых 27 - российских и 332- зарубежных.

## ГЛАВА 1 - ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 - Магнитные наночастицы оксида железа в биомедицине

Магнитные наночастицы оксида железа (МНЧ), такие как магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), гематит ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) и маггемит ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), являются наиболее изученным типом наночастиц, обладающих магнитными свойствами, что обуславливает их широкое применение в областях визуализации, нацеливания, доставки различных агентов (лекарств, антител, белков и т.д.) и биосенсоров, разделении биомолекул и т.д. [168, 197]. Существует широкий спектр вариаций в части физико-химических и магнитных характеристик наночастиц за счет различных методов их синтеза и модификации их поверхности. МНЧ обладают способностью к биологическому катализу, возможностью управления их перемещением в организме под воздействием магнитного поля, возможной индукции их нагрева, а также возможности их визуализации в организме [168].

С учетом многофункциональности МНЧ, особое внимание уделяется исследованию возможности их использования в онкологии [15, 19, 184]. Данный вид наночастиц является перспективным агентом в рамках концепции тераностики, подразумевающей сочетание мультимодальной визуализации и комбинированных терапевтических подходов [225]. МНЧ используются в синтезе искусственных антигенпрезентирующих клеток для иммунотерапии рака. Было показано, что наноразмерные искусственные антигенпрезентирующие клетки индуцировали пролиферацию антиген-специфических Т-клеток из спленоцитов мыши и Т-клеток периферической крови человека, а также при введении *in vivo* усиливали отторжение опухоли в модели подкожной меланомы мыши [231]. С учетом пероксидазоподобной и каталазоподобной активности МНЧ [166] исследуется возможность их использования в качестве имитатора ферментов для биомедицинских приложений (т.н. «нанозимы») [35]. Ферментативная активность МНЧ

способна усиливать сигнал обнаружения с помощью колориметрической реакции (что может быть использовано в иммуноферментном анализе (ИФА) и других молекулярных методах обнаружения), а также генерировать активные формы кислорода (АФК), убивающие бактерии и клетки [139]. Последнее свойство делает «нанозимы» перспективными агентами для диагностики и терапии опухолей [171, 224]. Так, показано, что МНЧ вызывают трансформацию макрофагов в провоспалительный фенотип и тем самым ингибируют рост опухоли [133]. Рассматривается возможность использования МНЧ для индукции ферроптоза в рамках разработки противоопухолевой стратегии. Установлено, что МНЧ индуцировали в раковых клетках полости рта ферроптоз, что приводило к генерации АФК, перекисному окислению липидов митохондрий и снижению уровня глутатионпероксидазы в субклеточных органеллах [52]. Также МНЧ исследуются в качестве антибактериальных и противовирусных агентов. В работе [71, 349] продемонстрирована способность МНЧ за счет индукции перекисного окисления липидов в оболочке вызывать инактивацию вирусов гриппа. Установлена способность МНЧ подавлять рост различных бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis*) [176, 310]. Создание комплексов иммунных клеток с наночастицами также является перспективным подходом к разработке систем доставки, опосредованной клетками [17]. Несмотря на высокий интерес к МНЧ как к средствам, потенциально пригодным для использования в широком спектре биомедицинских задач, лишь отдельные лекарственные формы на основе МНЧ используются в клинической практике [165, 190, 359]. При этом, для части из отдельных разрешенных ранее для клинического использования нанопрепаратов на основе оксида железа, было прекращено обращение и клинические испытания в связи с недостаточной эффективностью и наличием побочных эффектов [232].

### **1.1.1 - Магнитные наночастицы оксида железа как диагностические агенты**

Магнитные наночастицы на сегодняшний день рассматриваются как перспективные многофункциональные диагностические агенты, которые могут применяться в различных условиях (*in vitro*, *in vivo*) и для решения различных задач [59, 276, 303]. МНЧ за счет наличия магнитных свойств активно разрабатываются как многообещающее средство для диагностики широкого спектра заболеваний, включая рак [217], сердечно-сосудистые заболевания [344] и неврологические заболевания [192] и т.д. МНЧ являются перспективными диагностическими агентами для диагностики ранних стадий онкологических заболеваний [1]. На сегодняшний день существует целый ряд уже разрешенных для клинического применения диагностических средств на основе МНЧ [352].

Определяющее значение для магнитных свойств МНЧ имеют кристалличность и размер ядра магнетита, обуславливающиеся условиями синтеза наночастиц. Модификация поверхности МНЧ различными способами также может обеспечивать свое влияние на эффективность МНЧ как контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) за счет повышения локального накопления МНЧ в поврежденном участке при одновременном снижении концентрации наночастиц в здоровой (фоновой) ткани [95], а также для снижения способности наночастиц к агрегации и повышения их биосовместимости [198]. Существует подход для повышения функциональности МНЧ как диагностического агента, основанный на сочетании МНЧ с другими видами наночастиц, белками или красителями для обеспечения одновременного использования различных диагностических методов в рамках стратегии мультимодальной визуализации [34, 54, 143, 175, 296]. Так, Xie J соавт. [250] разработали МНЧ для мультikomплексной визуализации, включающей МРТ, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), ближнюю инфракрасную флуоресценцию. МНЧ были

модифицированы дофамином, инкапсулированы в матрицы сывороточного альбумина человека и помечены двумя красителями (64 Cu-DOTA и Cy5.5). Эффективность данных МНЧ была продемонстрирована на модели мыши с подкожным ксенотрансплантатом U87MG (глиобластома человека). МНЧ, модифицированные полиакриловой кислотой и покрытые гидроксидом алюминия показали свою пригодность в качестве контрастных агентов двойной МРТ/ПЭТ для визуализации клеток [100]. В работе [84] была определена возможность долгосрочной (до 4-х недель) визуализации эмбриональных стволовых клеток и дифференцированных эндотелиальных клеток, меченных МНЧ за счет лизосомного хранения наночастиц в клетках.

### **1.1.2 - Магнитные наночастицы оксида железа как гипертермические агенты**

Активация МНЧ с целью высвобождения наночастицами тепла в настоящее время исследуется как метод целевого нагрева опухолей для обеспечения их термической деструкции и нарушения деления (индуцированная гипертермия), а также для обеспечения повышения чувствительности опухоли к химиотерапевтическому воздействию [25, 147, 334]. В исследовании [280] было показано, что опухолевые клетки не обладают повышенной чувствительностью к гипертермическому воздействию по сравнению со здоровыми клетками. Однако ранее [116] было показано, что реакция опухолевой ткани на тепловое повреждение отличается от таковой у здоровых тканей. Так, при нагреве здоровой ткани до 45 °С, времени воздействия 30–60 минут и скорости нагрева до 0,7 °С мин<sup>-1</sup> сосудистая сеть обеспечивает повышение кровотока, рассеивая тепло и предотвращая чрезмерный нагрев тканей. Воздействие высокой температуры на опухолевую ткань из-за дезорганизованности и дисфункциональности ее сосудистой сети обуславливает нарушение перфузии ткани, а также увеличивает жесткость эритроцитов, приводя к расширению сосудов, к застою крови, набуханию

эндотелия и нарушению эндотелиальной выстилки. Данные изменения обуславливают кровоизлияния, агрегацию эритроцитов и тромбоцитов, снижение доставки в опухоль кислорода и питательных веществ и накопление молочной кислоты.

Наиболее предпочтительным способом гипертермического воздействия на опухоль можно рассматривать избирательную гипертермию с использованием подходов, обеспечивающих локальное накопление в опухолевой ткани агентов, способных к индуцированному нагреву. Как правило, гипертермическая терапия включает локальное повышение температуры опухоли в диапазоне 43-46 °C [105, 323]. При этом, с учетом зависимости нагрева от концентрации наночастиц, для обеспечения гипертермического эффекта необходимо достичь накопления в зоне интереса высоких концентраций наночастиц [28]. Следует отметить, что характеристика поверхности, размер наночастиц, а также их дисперсность играют значительную роль в эффективности нагрева МНЧ [108, 156, 163, 328]. Так, показано, что МНЧ с высокой агрегативной устойчивостью характеризуются более высокой способностью к нагреву по сравнению с агрегирующими наночастицами [94].

В ряде работ показано, что МНЧ способны оказывать повреждающее действие на опухолевые клетки и без значительного повышения температуры. Так, в работе [115] сообщается, что МНЧ, конъюгированные с эпидермальным фактором роста (EGF) и нацеленные на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), обуславливают выраженное (до 99,9%) снижение жизнеспособности опухолевых клеток без повышения температуры до уровня, обуславливающего макроскопические нарушения на уровне ткани. В этом случае повреждающий эффект МНЧ реализуется за счет локального повышения температуры в лизосомах, вызывающей гибель клеток через лизосомные пути.

Самые ранние работы, посвященные обоснованию подхода, включающего локальный нагрев опухоли под воздействием наночастиц



оксида железа относятся к 50-м годам прошлого столетия [285]. На сегодняшний день стратегии обеспечения селективного накопления наночастиц включают инъекцию магнитных наночастиц непосредственно в опухоли и последующее возбуждение этих наночастиц переменными магнитными полями для выделения тепла, а также использование для направления наночастиц к опухолям различных нацеливающих агентов (антитела) [115]. Данный подход уже успешно реализуется в технологии NANOTHERM-терапии [221] для лечения глиобластомы и рака предстательной железы [165], основанной на введении в оптимальные (определенные программным приложением) участки опухоли микрочастицы оксида железа и их нагреве с помощью аппаратного воздействия магнитным полем. В работе [137] исследовано средство адресной доставки доксорубина - магнитного термочувствительного гидрогеля на основе нанокompозитов (включающих МНЧ, оксид графена, полиэтиленимин) для интратуморального введения, в ходе которой была продемонстрирована его эффективность как средства для химиотерапевтического воздействия и магнитной гипертермии. Также предложен подход к повышению селективности нагрева опухоли в виде импульсного режима воздействия магнитного поля [214]. В качестве индукторов нагрева наночастиц рассматриваются лазеры, переменное магнитное поле, ультразвук [164, 213, 238]. Недостатком внутриопухолевых инъекций МНЧ является инвазивность процедуры введения, а также не всегда равномерное распределение наночастиц в опухоли [258]. Ряд авторов склоняется к большей эффективности внутривенного введения наночастиц для обеспечения гипертермического воздействия на опухоль, характеризующегося минимальной инвазивностью и однородностью распределения наночастиц без образования кластеров [200].

Известно, что способность к нагреву наночастиц зависит множества характеристик, таких как форма, размер, наличие и характеристики (толщина, качественный состав, определяющий в том числе теплопроводность) покрытия наночастиц, их коллоидная устойчивость [194, 247, 287, 300]. Так,

показано, что наночастицы оксида железа кубической формы характеризуются большей удельной скоростью поглощения (характеризующей нагрев наночастиц) по сравнению со сферическими наночастицами оксида железа [45]. При сравнительном анализе способности к нагреванию наночастиц магнетита, характеризующихся различными формами (сферической, кубической, стреловидной, октаэдрической) и размером, удалось ранжировать исследованные наночастицы по их способности к нагреву. Было установлено, что для наночастиц магнетита октаэдрической формы удельная скорость поглощения больше, чем для сферических наночастиц [123]. Также известно, что с уменьшением размера наночастиц уменьшается их намагниченность [284], обуславливающая способность наночастиц к нагреву в условиях индукции магнитным полем. Для магнитных наночастиц оксида железа определен оптимальный размер, приводящий к усилению эффектов гипертермии [185], попадающий в диапазон от 15 до 100 нм. Данный диапазон оптимален для интернализации наночастиц в опухолевые клетки с целью внутриклеточной гипертермии [249].

## **1.2 - Подходы к модификации поверхности магнитных наночастиц оксида железа с помощью покрытия оболочками**

Для синтеза магнитных наночастиц оксида железа разработаны различные методы: химические (термическое разложение, соосаждение, золь-гель метод, метод микроэмульсии и т.д.), физические (метод пиролиза) и биологический метод, основанный на использовании растительных экстрактов или продуктов микробного происхождения [23, 127, 212]. При этом соотношение между размером, формой, свойствами поверхности и магнетизмом МНЧ, определяемое условиями синтеза, играет решающую роль в проявлении наночастицами биологических свойств. Основным недостатком наночастиц с немодифицированной поверхностью является их накопление вне органов-мишеней [5]. Для улучшения физико-химических свойств

наночастиц, предотвращения их агломерации и окисления, для повышения их биосовместимости, а также для обеспечения желаемых характеристик в соответствии с актуальными биомедицинскими задачами используется подход, заключающийся в модификации их поверхности материалами неорганической и органической природы [3, 21, 307], который может реализовываться как на этапе синтеза наночастиц, так и после их получения. Кроме того, нанесение оболочки может быть использовано для дальнейшей функционализации МНЧ с присоединением фармакологических агентов к их поверхности или инкорпорирования таковых в состав самой оболочки [142, 244, 309]. Показано, что использование различных методов конъюгации антител с помощью различных покрытий МНЧ может влиять на обнаружение биоаналитов (например, биомаркеров рака). Так, при исследовании МНЧ, покрытых различными оболочками (аминосианом и декстраном), предназначенных для конъюгирования антител с одноцепочечными вариabельными фрагментами с целью обнаружения белка рецептора 2 эпидермального фактора роста человека, избыточная экспрессия которого характерна для нескольких типов человеческих карцином, было установлено, что иммуноконъюгат обладает направленной на биомаркеры активностью, что может быть использовано для биомагнитной детекции [97].

Модификация поверхности МНЧ с помощью поверхностно-активных веществ (ПАВ) позволяет повысить стабильность наноструктур, улучшить их дисперсность [272]. Также показано, что покрытие МНЧ различными биосовместимыми ПАВ (глутаминовая кислота, лимонная кислота, поливинилпирролидин, этилендиамин и бромид цетилтриметиламмония) обеспечивает повышенную эффективность нагрева, что может быть использовано в рамках стратегии гипертермического воздействия на опухоль [273].

Высокий потенциал для использования в биомедицинских областях (адресная доставка лекарств, гипертермическое противоопухолевое воздействие, МРТ) демонстрируют гибридные наноструктуры, включающие

углеродные наноматериалы (углеродные нанотрубки, графен) и МНЧ [62, 68]. Углеродные наноматериалы обладают большой площадью поверхности, способной адсорбировать или конъюгировать с широким спектром терапевтических и диагностических агентов (антитела, лекарственные препараты, гены, вакцины, и т. д.) [69, 122]. Так, нанокомпозиты МНЧ-углеродные нанотрубки показали свою эффективность в качестве средства адресной доставки одновременно двух противоопухолевых препаратов - гидрохлорида эпирубицина и паклитаксела, что позволяет рассматривать данный вид наночастиц потенциально пригодным для лечения рака с применением комбинированного химиотерапевтического воздействия [265]. Также комбинация МНЧ с многослойными углеродными нанотрубками позволила значительно усилить контраст при МРТ в эксперименте *in vivo* на модели рака печени у мышей [196]. Применение подходов к созданию многокомпонентных гибридов позволяет достичь синергизма свойств различных материалов, входящих в состав наноггибрида, позволяя улучшить (или расширить) их свойства относительно однофазных наноструктур [220]. Многокомпонентный наноггибрид, включающий МНЧ, углеродные нанотрубки и графен был исследован в качестве pH-чувствительного наноносителя лекарств для лечения рака. Было показано, что данный наноггибрид эффективно интернализуется клетками клеток рака печени человека, не обладая при этом цитотоксическим эффектом, а также характеризуется pH-активированным профилем высвобождения лекарств [355].

Широко используемым неорганическим материалом для модификации МНЧ является диоксид кремния (кремнезем) [14, 85, 263], позволяющий обеспечить повышение агрегативной устойчивости МНЧ, а также снижение их токсических эффектов. Так, показано, что покрытие МНЧ диоксидом кремния позволяет уменьшить (за счет снижения окислительного стресса) цитотоксичность наночастиц в отношении клеток A549 (карцинома легкого человека) и HeLa (карцинома шейки матки человека) [336]. МНЧ с оболочкой

из диоксида кремния также показали высокую биосовместимость в отношении макрофагов и дендритных клеток человека и, кроме того, продемонстрировали эффективность в качестве диагностических агентов [112]. Также в работе [128] показана возможность использования композитных наночастиц оксида железа с кремнеземом в качестве средства адресной доставки лекарств.

Благодаря хорошей растворимости в воде и биосовместимости, полисахариды также являются одними из наиболее часто используемых покрытий, позволяющих существенно повысить коллоидную устойчивость МНЧ [29, 44]. Кроме того, модификация поверхности МНЧ глюкозой позволяет обеспечить специфические взаимодействия между опухолевыми клетками, сверхэкспрессирующими переносчики глюкозы (Glut) и МНЧ, обуславливая при этом и возможность визуализации МРТ [222, 261, 321]. Оболочка из декстрана позволяет повысить биосовместимость МНЧ [289].

Модификация поверхности МНЧ с помощью полимеров является наиболее широко используемым подходом при синтезе магнитных наночастиц, предполагаемых к использованию в биомедицинских целях. Полиэтиленгликоль – это стабильный, биосовместимый гидрофильный полимер, используемый с целью уменьшения фагоцитарного захвата наночастиц иммунной системой и обеспечивая тем самым увеличение времени циркуляции наночастиц в кровотоке и их последующее накопление в ткани-мишени [297]. Также показано, что покрытие МНЧ полиэтиленгликолем позволяет снизить их токсичность в отношении эндотелиальных клеток [101]. Хитозан, характеризующийся способностью к биодegradации и высокой биосовместимостью [8] также широко используется для модификации поверхности МНЧ [79, 111, 255, 282, 313]. Показано, что в рамках разработки средства адресной доставки химиотерапевтических препаратов с рН-зависимым высвобождением препарата, включение хитозана в наногибриды химически восстановленного оксида графена и МНЧ позволило обеспечить повышение стабильности наночастиц, растворимости и

биосовместимости [224]. Полилактид также является распространенным полимером, используемым для модификации МНЧ [32, 58, 154, 243], интерес к которому в значительной степени обусловлен его универсальностью в части получаемых свойств (которые можно изменять посредством условий синтеза), его биodeградируемостью и высокой биосовместимостью [38].

Альбумин человеческого или животного происхождения, является биосовместимым материалом, используемым для модификации поверхности МНЧ, обладающим высокой биосовместимостью, способным придавать коллоидную устойчивость МНЧ, улучшать фармакокинетику пептидных или белковых препаратов, а также преимущественно поглощаемым опухолями и тканями с воспалительным процессом [183]. Большое количество работ с применимым подходом в части модификации МНЧ оболочкой из альбумина посвящено разработкам средств адресной доставки лекарств, диагностических агентов [39, 40, 63, 99].

Металлы (золото, серебро, медь, палладий, платина) представляют отдельный интерес для модификации поверхности МНЧ. Металлические покрытия МНЧ облегчают дальнейшую функционализацию наночастиц с целью повышения их стабильности и биосовместимости [356]. Золото благодаря химической стабильности и биосовместимости, а также наличию оптических свойствам, широко используется для модификации поверхности МНЧ [24, 150, 264]. При этом оболочка из золота действует как барьер, предотвращающий окисление ядра и ферментативную деградацию МНЧ [218]. Уникальные оптические свойства золота обуславливают рассмотрение наногибридов МНЧ-золото как перспективных тераностических агентов [201, 322]. Также оболочка из золота позволяет функционализировать МНЧ антителами, нацеленными на молекулы, которые дифференциально экспрессируются в интересующей ткани [308]. Сочетание МНЧ с платиной позволяет обеспечить превосходные суперпарамагнитные свойства наночастиц, а также устойчивость МНЧ к окислению [105]. Наночастицы, содержащие в своем составе МНЧ и платину изучаются в качестве

гипертермических противораковых агентов, контрастных агентов для МРТ, магнитного разделения биомолекул [131, 251, 353]. В работе [160], посвященной сравнительной оценке биосовместимости нанокompозитов МНЧ-платина, характеризующимися различными размерами, показано отсутствие цитотоксического действия МНЧ при концентрациях железа < 10 мМ, и незначительное токсическое действие МНЧ (жизнеспособность клеток достигала 75%) при их максимальной концентрации (100 мМ).

### **1.3 - Механизмы токсичности магнитных наночастиц оксида железа**

Несмотря на большое количество работ, посвященных оценке токсических эффектов наночастиц и исследованию механизмов их реализации [77, 86, 199, 241, 337, 346] на сегодняшний день не сформировано однозначного представления о механизмах, лежащих в основе взаимодействия МНЧ с биологическими объектами различного уровня (клетками, тканями, организма в целом) [337]. Данный факт в значительной степени обусловлен тем, что токсичность МНЧ определяется большим количеством факторов, обусловленных условиями синтеза, среди которых можно выделить размер и форму наночастиц, характеристики их поверхности (включая химический состав и морфологию поверхности, пространственное расположение функциональных групп, наличие/отсутствие оболочки и ее качественный состав). Также наночастицы одинакового качественного состава, но синтезированные различными способами, могут обладать различным профилем биосовместимости. При этом используемые дозы и способ/режим введения, а также тип клеток/тканей, подвергшихся воздействию наночастиц также обеспечивают свой вклад в формирующийся ответ организма [259, 311, 346].

Общепризнанным механизмом токсичности наночастиц является интенсификация процессов свободно-радикального окисления [125, 206]. Избыточное железо-опосредованное образование активных форм кислорода

(АФК), приводящее к окислительному стрессу [159], характеризующимся дисбалансом между производством АФК и способностью организма инактивировать реактивные промежуточные соединения и/или восстанавливать уже полученные повреждения за счет эндогенных антиоксидантных защитных систем (витамин С, витамин Е, глутатион и антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и т.д.). Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза обуславливает активацию сигнальных путей, факторов транскрипции и цитокинового каскада, обеспечивая различные клеточные ответы [206], способные приводить в конечном счете к развитию патологических эффектов (воспаление, фиброз, генотоксичность). Установлена взаимосвязь между накоплением наночастиц в конкретных органах и обеспечением в отношении них АФК-повреждающего действия наночастиц [277].

В случае предполагаемого использования МНЧ в онкологии, генерация АФК может рассматриваться как элемент токсического воздействия на опухоль [37, 215]. Показано, что повреждающий АФК-опосредованный эффект на опухолевые клетки зависит от дозы наночастиц и времени их воздействия. Во многих работах продемонстрировано, что с увеличением концентрации наночастиц отмечается усиление генерации АФК, что, в конечном счете, приводит к повреждению и гибели клеток [88, 125].

При попадании наночастиц в системный кровоток они могут взаимодействовать с клетками крови, белками и эндотелиальными клетками, а также с ключевыми компонентами системы свертывания (тромбоциты, факторы свертывания). Проблемы возможных нежелательных про- и антикоагулянтных свойств наночастиц рассматриваются во многих работах [82, 153, 234]. Так, в исследовании [82], посвященном исследованию влияния интратрахеального введения наночастиц на основе оксида железа на систему гемостаза, было показано изменение параметров коагуляции через 30 суток после введения наночастиц, выразившихся в виде удлинения



активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и протромбинового времени (ПВ). Также была показана способность наночастиц при их внутривенном введении активировать калликреин-кининовую систему [90]. Влияние на систему свертываемости крови в условиях ингаляционного введения наночастиц оксида железа показано в работе [82]. В данной работе установлено, что введение крысам МНЧ различного размера (22 и 280 нм) обуславливало генерацию АФК в клетках, гиперемию, гиперплазию и фиброз ткани легких, а также вызывало нарушение системы свертываемости.

Воздействие наноматериалов на систему свертывания можно разделить на две категории: контакт с факторами свертывания (абсорбция/связывание факторов свертывания на поверхности наночастиц) и непосредственное взаимодействие с клетками (например, тромбоцитами, эндотелиальными клетками и моноцитами). Результатом взаимодействия наночастиц с факторами свертывания может явиться либо инактивация факторов или снижение их доступности для других компонентов каскада коагуляции и, как следствие, пролонгирование или недостаточность реакций коагуляции, либо их контактная активация, обуславливающая избыточную коагуляцию (гиперкоагуляцию). Взаимодействие с клетками может модулировать их активность и также вызывать нежелательные эффекты. Так, взаимодействие наночастиц с эндотелиальными клетками может индуцировать воспаление и развитие оксидативного стресса, в то время как влияние наночастиц на тромбоциты может обуславливать их активацию. Кроме того, нарушения коагуляции могут быть обусловлены изменениями как количественных (количество эритроцитов, гематокрит), так и качественных (деформируемость, агрегация и т.д.) характеристик эритроцитов.

Литературные данные не позволяют сделать однозначный вывод о наличии четкой взаимосвязи между размером наночастиц и их влиянием на систему гемостаза. Так, в работе [41] показано, что внутрибрюшинное введение крысам наночастиц кремнезема размером 50 и 500 нм обуславливает

гиперкоагуляционный сдвиг в системе гемостаза, причем больший по выраженности эффект оказывают наночастицы меньшего размера. Между тем, результаты эксперимента *in vitro* [306] демонстрируют отсутствие зависимости оказываемых наночастицами оксида цинка размером 20 и 100 нм на систему гемостаза эффектов от размера. При этом в данной работе показано дозозависимое влияние указанного вида наночастиц на внешний и внутренний пути коагуляции (увеличение ПТ и АЧТВ) за счет адсорбции на своей поверхности факторов свертывания. Также было показано влияние карбоксилмодифицированных наночастиц полистирола различного размера на внутренний путь каскада коагуляции за счет взаимодействия с факторами внутреннего механизма коагуляции, при этом оказываемые эффекты наночастиц зависели от их размера: наночастицы большего размера (более чем 200 нм) обуславливали его активацию, тогда как наночастицы меньшего размера (около 20 нм) – ингибирование контактного пути свертывания [298].

Адсорбция белков на поверхности МНЧ при их введении в кровоток с образованием белковой короны, обеспечивает значительное влияние на их взаимодействие с компонентами крови и в числе прочих эффектов может обуславливать клеточную активацию [104, 109, 271, 283]. Показано, что МНЧ, модифицированные полиакриловой кислотой, разрушают эритроциты и обеспечивают активацию комплемента, причем данный эффект зависит от характеристик МНЧ (в частности, от их размера) [326]. При этом в этой же работе отражены сведения о снижении оказываемых МНЧ эффектов при модификации поверхности МНЧ гиалуроновой кислотой и хитозаном.

Продемонстрировано, что взаимодействие наночастиц с эритроцитами может вызывать нарушение целостности их мембран в результате механического повреждения или действия АФК, а также агрегацию эритроцитов, что в свою очередь, может вызывать изменения реологических свойств крови [295]. Эти сведения соотносятся с данными других авторов, которые продемонстрировали способность МНЧ вызывать повреждение

эритроцитов, приводя к их апоптотической гибели, а также влиять на реологию крови [124].

Следует отметить, что представленные литературные данные в отношении гемосовместимости МНЧ противоречивы. Так, в работе [190] показано отсутствие гемолитической активности в условиях *in vitro* у покрытых полиамфолитом МНЧ.

Адсорбция белков плазмы на поверхности частиц предшествует их распознаванию и поглощению макрофагами, находящимися в органах мононуклеарной фагоцитарной системы, что в конечном счете приводит к элиминации наночастиц из организма [228]. При этом общеизвестно, что взаимодействие наночастиц с биологическими компонентами (в том числе, белками), их клеточное поглощение, прохождение через мембраны тесно связаны с их физико-химическими характеристиками. В частности, гидродинамический размер наночастиц является одним из наиболее важных факторов, определяющим характер их распределения в организме [325, 346]. Так, в работе [301] показано, что магнитные наночастицы размером 10 нм активно накапливались в печени, в то время как наночастицы большего размера (40 нм) – в селезенке. В этой же работе продемонстрированы и различия в элиминации наночастиц в зависимости от их размера. В работе [13] показано, что НЧ оксида железа кубической формы, модифицированные липидной формуляцией в диапазоне размеров от 10 до 20 нм и гидродинамическим размером менее 100 нм активно накапливались в гепатоцитах (свыше 80% от введенной дозы), тогда как более крупные МНЧ аккумулировались в клетках Купфера и других компонентах ретикулоэндотелиальной системы.

Характеристика поверхности наночастиц (отсутствие/наличие оболочки, ее качественный состав) за счет влияния на процесс опсонизации также способно обуславливать изменение тропности к органам и тканям [47]. При этом накопление конкретных наночастиц в отдельных органах (тропность к тканям) с одной стороны можно рассматривать как их преимущество для

направленного транспорта лекарств. С другой стороны, длительное нахождение наночастиц в органах может обуславливать развитие воспалительной реакции и фиброз, а также способствовать формированию токсических эффектов наночастиц за счет образования АФК [167, 337]. Системы органов, проявляющие потенциальные токсические эффекты при введении наночастиц оксида железа, включают нервную систему [172], сердце и легкие, щитовидную железу и органы мононуклеарной фагоцитарной системы [248]. Отдельное внимание уделяется влиянию МНЧ на репродуктивную систему [173]. Данные об иммуногенности МНЧ разнятся, что, вероятно, связано с различиями в характеристиках наночастиц. Существуют данные о способности МНЧ активировать моноциты, что, через продукцию вторичных мессенджеров, приводит к увеличению цитоплазматической вакуолизации, набуханию митохондрий и гибели эндотелиальных клеток [119]. Также показано, что МНЧ способны изменять функции цитоскелета и ионных каналов, в моноцитах [83]. Однако в работе [141] показана способность МНЧ подавлять индуцированную липополисахаридами активацию ядерного фактора каппа В и продукцию провоспалительных цитокинов в первичных моноцитах человека. В работе [110] показана способность МНЧ повышать уровни IL-1 $\beta$  в моноцитах человека, а также дифференцировку моноцитов в макрофаги.. Модификация поверхности наночастиц может являться инструментом для минимизации иммунного ответа и токсичности МНЧ в отношении органов за счет повышения агрегативной устойчивости наночастиц, снижения скорости высвобождения ионов и свободно-радикальной активности, а также за счет изменения их органотропности [75].

Также реализация повреждающего действия МНЧ может осуществляться опосредованно за счет агрегации наночастиц, обусловленной присутствием плазматических белков и солей в биологических средах. При внутривенном введении магнитных композитов формирование устойчивых агрегатов может обуславливать развитие нарушений со стороны

центральной гемодинамики и микроциркуляции на уровне различных органов (а именно, микроэмболизации) [136, 246, 254].

Влияние МНЧ на эндотелий также является ключевым звеном в обеспечении наночастицами системной токсичности при их внутрисосудистом введении. Известно, что нарушение функционирования системы эндотелия (эндотелиальная дисфункция) лежит в основе многих хронических заболеваний, обуславливая развитие и прогрессирование легочной артериальной гипертензии [121], хронической сердечной недостаточности [118], воспалительных заболеваний кишечника [120], сопровождая развитие хронической болезни почек [207], являясь критическим и пусковым фактором в генезе диабетических сосудистых осложнений [291] и т.д. Являясь первым барьером при внутривенном введении наночастиц в организм, именно эндотелий в первую очередь подвергается их воздействию. При этом наночастицы могут преодолевать эндотелиальный барьер посредством активного трансцеллюлярного (включающего поэтапно эндоцитоз с просветной стороны эндотелия, прохождение через эндотелиальную клетку и экзоцитоз на базальной поверхности эндотелиальной клетки) и параклеточного (основанного на диффузии между клетками) механизмов [181]. Трансцеллюлярный транспорт наночастиц сопряжен с возможностью их накопления в эндотелиальной клетке и, в случае наличия у наночастиц токсичности в отношении эндотелиальной клетки, ее последующей гибелью [286]. Так, показано, что МНЧ с модифицированной димеркаптоянтарной кислотой поверхностью накапливаются в цитоплазме эндотелиальных клеток аорты человека и обеспечивают в дозе 0,05 мг/мл снижение их жизнеспособности, свидетельствуя о наличии токсического эффекта у наночастиц в используемой дозе. При этом при использовании наночастиц в нетоксических концентрациях (0,02 мг/мл) отмечалось изменение метаболической функции эндотелия в виде снижения выработки эндотелина-1 и простациклина I-2. Также установлено, что воздействие данного вида наночастиц может активировать экспрессию генов, связанных с

окислительным стрессом и молекулами адгезии [324]. Wu X. и соавторы установили, что воздействие на эндотелиальные клетки пупочной вены человека МНЧ (HUVES), покрытых как лимонной кислотой, так и декстраном, приводит к дозозависимому снижению их жизнеспособности через апоптоз [335]. Активная интернализация эндотелиоцитами МНЧ, покрытых декстраном, показана также в работе [174], в которой продемонстрирован защитный эффект наночастиц в отношении HUVES, находящихся в условиях окислительного стресса, за счет запуска аутофагии. Следует отметить, что аутофагия при различных условиях может обеспечивать как выживаемость клеток, играя защитную роль в ответ на токсическое воздействие наночастиц, так и их гибель [114]. При изучении влияния модифицированных МНЧ (дофамином, диметилкаптоянтарной кислотой и полимером допамин-полиакриловая кислота-полиэтиленгликоль) на опухолевые клетки крови человека (клетки множественной миеломы и клетки лейкемии), подвергнутые противораковой терапии (доксорубин, бортезомиб), было показано повышение уровня Beclin 1 и VPS34 и снижение Bcl-2, способствующих образованию критического комплекса в инициации аутофагии, что обеспечивало снижение цитотоксического действия противоопухолевых препаратов. Данный эффект наблюдался не только на опухолевых, но и на здоровых клетках крови [132].

Взаимодействие наночастиц с эндотелиоцитами также в значительной степени определяются физико-химическими характеристиками наночастиц. Так, показано, что МНЧ стержневидной формы активнее интернализировались в эндотелиоциты по сравнению со сферическими наночастицами как в условиях наличия, так и отсутствия воздействия внешним магнитным полем [103].

Еще одним эффектом наноразмерных частиц оксида железа в отношении эндотелия рассматривается повышение его проницаемости, реализуемое за счет увеличения межклеточных промежутков в монослое эндотелиоцитов при воздействии на клетки наночастиц [286]. В работе [169]

показано, что данный эффект реализуется за счет генерации АФК, обуславливающей ремоделирование микротрубочек в эндотелиальных клетках микрососудов человека через сигнальные пути Akt/GSK-3 $\beta$ . Определена способность МНЧ изменять морфологию эндотелиоцитов и их механические свойства [65].

Также показано, что МНЧ даже в нетоксических концентрациях могут способствовать АФК-обусловленному (за счет пероксидазоподобной активности МНЧ) приобретению HUVEC мезенхимального фенотипа [170].

Следует отметить, что на сегодняшний день однозначного представления о взаимосвязи характеристик наночастиц с их биологическими эффектами на различных уровнях организма, а также механизмах реализации данных эффектов, не сформировано [337]. Также существуют расхождения в результатах, полученных в различных экспериментальных условиях (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) – зачастую данные для конкретного вида наночастиц, полученные на клеточных моделях, не находят своего подтверждения в условиях целостного организма [163]. Возможными причинами такого несоответствия могут являться различия в экспериментальных условиях, а также отсутствие сформированного фундаментального представления о взаимодействии наночастиц с различными уровнями организма [51, 158, 236, 332].

Данный факт, существенно сдерживающий внедрение МНЧ в клиническую практику, в определенной степени обусловлен и разнообразием характеристик самих наночастиц, а также различными биологическими эффектами наночастиц одинакового качественного состава, но синтезированных различными способами [76, 161]. Присутствие во время синтеза поверхностно-активных веществ, концентрация реагентов, температура реакции или время и т.д. может обуславливать различия в характеристиках получаемых МНЧ [287] и, следовательно, в их биологических эффектах, в том числе определяя их возможную область применения [36].

#### **1.4 - Патофизиологические основы направленной доставки химиотерапевтических препаратов**

Разработка систем адресной доставки химиотерапевтических препаратов на сегодняшний день является одной из актуальных задач медицины, направленной по повышению эффективности и безопасности химиотерапии (ХТ). Известно, что химиотерапевтические препараты при их внутривенном введении зачастую не обладают оптимальным для избирательного воздействия на опухоль тканевым распределением. Данный факт обусловлен наличием анатомических и физиологических барьеров в организме (гематоэнцефалический барьер, эндотелий сосудов, почечная фильтрация и печеночная деградация и т.д.), а также физико-химическими особенностями самих препаратов (низкая растворимость, стабильность т.д.) [106]. Низкая опухолевая специфичность химиопрепаратов обеспечивает развитие побочных эффектов, включающих как ранние проявления токсичности, так и отсроченные (поздние) признаки токсичности на уровне различных органов и систем, интенсивность которых может варьировать от слабой до крайне тяжелой степени.

Концепция адресной доставки базируется на использовании наноразмерных наночастиц, ассоциированных посредством различных методов с лекарственным препаратом. При этом наночастицы выступают в качестве средства, способного за счет различных механизмов обеспечивать локальное накопление препарата в участке интереса. В качестве носителя лекарств при этом могут выступать представители широкого спектра наночастиц, относящихся к различным классам: органические (например, липосомы, полимерные наночастицы) и неорганические (наночастицы золота, наночастицы оксида железа, наночастицы кремнезема и т.д.) наночастицы, а также гибридные наночастицы, включающие комбинацию органических и неорганических гибридных наноматериалов [31, 274, 319].



При этом разрабатываемые стратегии направленного транспорта химиотерапевтических препаратов ориентируются в двух направлениях: пассивная доставка (пассивный таргетинг/нацеливание), реализующаяся за счет облегченного преодоления естественных барьеров из-за структурных особенностей тканей и специфических особенностей сосудистой сети опухоли, а также активная доставка (специфическая доставка или активный таргетинг/нацеливание), основанная на дополнении механизмов пассивной доставки условиями, обеспечивающими управление перемещением в организме ассоциированного с наноразмерным носителем химиопрепарата [18].

В качестве дополнения к эффектам пассивного и активного нацеливания перспективным подходом является разработка систем доставки, способных также реагировать на различные стимулы, являющиеся характерными особенностями опухолевой ткани (рН среды, температура и т.д.) [237, 252, 278, 290] и обеспечивающих тем самым не только опухолеспецифичное воздействие, но и контролируемое высвобождение и дозирование препарата.

#### **1.4.1 - Пассивная направленная доставка химиотерапевтических препаратов**

Развитие рака сопровождается широким спектром структурных и метаболических изменений на всех уровнях организма (органном, тканевом, клеточном, молекулярном) [89, 134, 140]. За счет высокой пролиферативной активности опухолевых клеток солидные опухоли характеризуются гипоксической средой, обуславливающей сигналинг фактора, индуцируемого гипоксией-1, что приводит к прогрессирующей, но дисфункциональной васкуляризации [70, 113, 145, 152].

Сосудистая сеть в опухоли как правило представлена неупорядоченным лабиринтом сосудов с повышенной проницаемостью [191]. Так, для капилляров солидных опухолей фенестры между эндотелиальными клетками

в зависимости от типа опухоли могут составлять от 380–780 нм до 1,2 мкм, что значительно превышает их размеры в физиологических условиях (от 6 до 12 нм). Нарушенная архитектура сосудистой сети и сопротивление кровотоку, обусловленное неправильной формой и изменяющимся на протяжении сосудов диаметром, определяют значительно нарушенную функциональность сосудистой сети опухоли [294, 354]. Данные изменения обуславливают возможность избирательного выхода наночастиц из сосудистого русла в опухолевую ткань. При этом имеющиеся нарушения лимфатического дренажа обеспечивают эффект удержания наночастиц в опухоли. Так, наночастицы размером менее 4 нм могут реабсорбироваться и диффундировать обратно в кровотоки, в то время как обратной диффузии более крупных наночастиц препятствует их гидродинамический радиус, что приводит к их накоплению в интерстиции опухоли [275].

Таким образом, традиционно считается, что концепция пассивной адресной доставки лекарств основывается на эффекте «повышенной проницаемости и удержания» [208], подразумевающей экстравазацию наночастиц, ассоциированных с химиопрепаратом, в интерстициальную жидкость в участке локализации опухоли за счет повышенной проницаемости сосудов и их удержанием в опухолевой ткани за счет отсутствия адекватного лимфодренажа и наличия плотного внеклеточного матрикса [275]. Исследования продемонстрировали, что время удержания в опухоли лекарств, ассоциированных с наночастицами, в 10 раз больше, чем у лекарств в «свободной форме» [227]. В последнее время обсуждается возможность попадания наночастиц из кровеносных сосудов в опухоль за счет активных трансэндотелиальных механизмов [327], а также эффект удержания наночастиц, реализуемый иммунными клетками микроокружения опухоли [342], что расширяет имеющееся представление о данном эффекте.

На реализацию эффекта «повышенной проницаемости и удержания» оказывает большое количество факторов, включающих физиологические особенности самого пациента, а также его клиническое состояние. Кроме того,

различная локализация опухоли, анатомические и пато-/физиологические различия в развитии разных видов опухолей также обуславливают различные проявления данного эффекта [253]. В исследовании на модели опухоли у собак с использованием подхода адресной доставки с помощью липосом [257] было показано, что, несмотря на то, что эффект «повышенной проницаемости и удержания» является преобладающим признаком в некоторых солидных опухолях (например, карциноме), обуславливая накопление липосом, его нельзя распространить на все солидные опухоли. Так, опухоли, содержащие большое количество сосудов, демонстрируют выраженный эффект «повышенной проницаемости и удержания», в то время как гиповаскулярные опухоли (рак простаты, рак поджелудочной железы и т.д.) будут характеризоваться неудовлетворительными результатами при пассивной адресной доставке ассоциированных с носителем химиопрепаратов. В условиях роста опухоли происходит сдавление кровеносных сосудов, что также может обеспечивать изменение эффекта в динамике развития опухоли в виде снижения эффективности селективного накопления наночастиц [73]. Кроме того, высокое давление межклеточной жидкости, определяемое неэффективным лимфодренажом, а также плотным внеклеточным матриксом, может препятствовать эффективной экстравазации наночастиц в дистальные участки опухоли [281].

Примером влияния клинического состояния пациента на реализацию эффекта пассивной доставки можно рассматривать уменьшение эффекта в условиях снижения артериального давления. Также на выраженность эффекта «повышенной проницаемости и удержания» оказывают влияние и физико-химические характеристики наночастиц (их размер и форма, модификация поверхности, качественный состав оболочки и т.д.), определяющие их «поведение» в организме (фармакокинетические параметры, взаимодействие с белками крови, прохождение через физиологические барьеры и т.д.) [177, 299, 302, 357]. С увеличением времени циркуляции наночастиц в кровотоке происходит их большее накопление в участке локализации опухолевого

процесса за счет эффекта «повышенной проницаемости и удержания». В связи с этим, для усиления данного эффекта может использоваться модификация поверхности наночастиц (различными полимерами, полиэтиленгликолем, пептидами, полисахаридами и т.д.), обуславливающая предотвращение их опсонизации плазменными белками, включая сывороточный альбумин, аполипопротеины, компоненты комплемента и иммуноглобулины, а также поглощение гепатоцитами и клетками Купфера. Увеличение периода полувыведения фармакологических агентов за счет увеличения их размера, превышающего порог почечного клиренса, также позволяет обеспечить эффективное накопление в опухолевой ткани. Так, показано, что инкапсуляция доксорубицина в липосомы приводит к увеличению его периода полувыведения до 2-3 дней [269]. Данный факт определяет в значительной степени эффективность липосомальной формы доксорубицина (Caelyx, Doxil).

Поверхностный заряд наночастиц, определяя их взаимодействие с белками и клетками, также обеспечивает влияние на эффективность их пассивной доставки. Так, липосомы с положительным зарядом характеризуются более эффективным накоплением в опухолевой ткани по сравнению с их аналогами, имеющими отрицательный или нейтральный заряд [72]. Обсуждается, что высокая степень биологической сложности микроооружения опухоли (экстрацеллюлярного матрикса), характеризующегося локальным распределением участков с различным зарядом (например, гепарансульфат, обладающий отрицательным зарядом, и молекулы нидогена, несущие положительный заряд), обеспечивает возможность подавления диффузного перемещения положительно и отрицательно заряженных наночастиц, что обуславливает их эффективный захват, ограничивая их подвижность в слое экстрацеллюлярного матрикса [188]. Форма наночастиц, являясь одним из ключевых параметров наночастиц, определяющих их взаимодействие с биологическими структурами, обеспечивает влияние на опухолеспецифичное накопление. Так, при сравнении мицелл нитевидной и сферической формы была показана большая

эффективность накопления мицелл нитевидной формы [135]. Установлено, что однослойные углеродные нанотрубки с высоким аспектным соотношением характеризуются более выраженной экстравазацией по сравнению с наночастицами сферической формы при схожих прочих условиях в части характеристик наночастиц (характеристика поверхности, площадь и заряд) [288]. Предполагается, что наночастицы стержневидной формы, обладающие большим по сравнению со сферическими наночастицами соотношением поверхность/объем, чем наносферы, способны к большей степени захвата в опухоли [314]. Установлено, что наночастицы неорганической природы, как правило, обеспечивают более высокую эффективность адресной доставки по сравнению с органическими наночастицами [43].

На сегодняшний день данный эффект продемонстрирован для широкого спектра наночастиц - липосом, нанодисперсного альбумина и его модификаций, мицелл, различного состава неорганических наночастиц, дендримеров и т.д., часть из которых уже внедрена в клиническую практику, а часть находится на стадии клинических испытаний. Отдельными примерами успешного использования в клинических условиях подхода пассивной адресной доставки являются липосомальные формы доксорубина (Doxil, Caelyx, Myocet), даунорубина (Daunoxome) и винкристина (Marqibo), мицеллярный паклитаксел (Genexol-PM), а также включенный в наночастицы альбумина паклитаксел (Abraxane).

Несмотря на значительный прогресс в разработках пассивной адресной доставки химиопрепаратов, остается актуальным вопрос обеспечения эффективности данного подхода. Вышеописанная гетерогенность эффекта «повышенной проницаемости и удержания» обуславливает неоднозначность выводов, полученных в клинических условиях, по эффективности пассивного направленного транспорта, основанного на эффекте «повышенной проницаемости и удержания». Согласно исследованию [43] очень незначительный процент (0,7%) от введенных в кровотоки наночастиц,

способных преодолевать биологические барьеры, может достигать клеток опухоли.

В настоящее время разрабатываются стратегии по улучшению эффекта пассивной адресной доставки. Так, разрабатываются новые стратегии к проведению ХТ, базирующиеся на уже используемых в клинических условиях способов пассивной доставки химиотерапевтических препаратов. Описаны попытки использования липосомальной формы доксорубина для проведения под давлением внутрибрюшинной аэрозольной ХТ метастатического рака брюшины, при котором химиопрепараты в аэрозольной форме вводятся в брюшную полость под давлением [126]. В исследовании [267] имплантация в опухоли полимерных пленок, пролонгировано высвобождающих паклитаксел, на модели рецидивирующей саркомы у мышей и модели немелкоклеточного рака легких показала более высокую эффективность в предотвращении локального рецидива после полной хирургической резекции опухоли по сравнению с внутривенным введением паклитаксела. Существует подход, основанный на комбинации стандартного способа введения липосомальной формы доксорубина и гипербарической оксигенации, обеспечивающий синергизм оказываемых эффектов, обуславливающий ингибирование роста опухоли [151]. Также описаны попытки использования фармакологических агентов (брадикинин (кинин), оксид азота, пероксинитрит, простагландины, фактор проницаемости сосудов (VPF) / фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и другие цитокины) для усиления эффекта «повышенной проницаемости и удержания», основываясь на способности временно улучшать перфузию опухоли за счет расширения сосудов [129, 180].

#### **1.4.2 - Активная направленная доставка химиотерапевтических препаратов**

Перспективной стратегией для обеспечения эффективного химиотерапевтического воздействия можно рассматривать применение подходов активного нацеливания лекарств как дополнение к механизмам пассивной адресной доставки [67, 223]. При этом разрабатываемые стратегии базируются на различных подходах.

Один из них основан на создании конструкции, в которой наноразмерный носитель ассоциирован с направляющими лигандами. В этом случае адресность доставки лекарства обеспечивается биологическим взаимодействием между лигандами на поверхности наночастиц и клеткой-мишенью. Лиганды могут быть химически сопряжены или физически адсорбированы на поверхности наночастиц после их образования, а также могут быть связаны с компонентами наночастиц на этапе синтеза наночастиц [211].

В качестве лигандов могут быть использованы антитела, обладающие высокой специфичностью, характеризующиеся, однако, при этом большим размером, ограничивающим плотность их распределения на поверхности наночастиц. Также недостатками моноклональных антител являются возможная иммуногенность, даже если они гуманизированы и их способность к агрегации в органах выделительной системы (печень и почки) [155].

Было показано фармакологическое преимущество использования системы доставки химиопрепаратов на основе наночастиц, ассоциированных с антителами, по сравнению подходом, основанном на использовании препарата, непосредственно конъюгированного с антителами [157].

Среди нацеливающих лигандов пептиды синтетического и естественного происхождения привлекают отдельный научный интерес в виду их безопасности, относительно небольшого размера (обеспечивающего возможность высокой плотности конъюгации), способностью расщепляться

протеолитическими ферментами и быстро выводиться из кровотока печенью и почками [55, 146].

В качестве примеров молекулярных мишеней можно представить семейство рецепторов эпидермального фактора роста (HER1-4), сверхэкспрессия которых обнаруживается при раке груди и раке желудка [9, 92]. Было показано, что липосомы с конъюгированными фрагментами антител против HER2, характеризовались более высоким связыванием *in vitro* по сравнению с нефункционализированными липосомами [304]. На сегодняшний день наночастицы, конъюгированные с рекомбинантным гуманизированным моноклональным антителом трастузумаб разрабатываются и для других типов опухолей HER2 +, включая опухоли яичников, мочевого пузыря, легких, поджелудочной железы [242].

Высокий уровень экспрессии рецепторов трансферрина в раковых клетках (гепатоцеллюлярная карцинома, рак желудка) определяет возможность разработок средств адресной доставки с конъюгированным трансферрином [316, 339].

Также в качестве мишеней рассматриваются рецепторы интерлейкина, экспрессируемые в некоторых типах глиом [230], комплекс интегрина альфа-6 и E-кадгерина, который присутствует на поверхности раковых клеток толстой кишки [30].

Показано, что наночастицы, функционализированные фолиевой кислотой, демонстрируют высокое сродство к рецепторам фолиевой кислоты [262]. Рецепторы фолиевой кислоты сверхэкспрессируются при ряде солидных опухолей (молочной железы, яичников, почек, поджелудочной железы, легких, толстой кишки, мочевого пузыря) [50, 186], что определяет возможный спектр использования данного подхода.

Стромальные компоненты опухоли, как незлокачественные клетки, так и внеклеточный матрикс также могут выступать в качестве мишени для активного нацеливания нанолекарств [66].



К сожалению, лиганд-специфичный подход активного нацеливания цитостатиков характеризуется сложностью конструирования комплекса. Наночастицы, предназначенные для использования в качестве средства активного транспорта химиотерапевтических препаратов должны иметь оптимальный размер и физико-химические свойства, соответствующие особенностям опухоли, а также должны обеспечивать контролируемое поступление препарата в опухоль, т.е. его высвобождение из наноносителя должно осуществляться в терапевтически эффективной концентрации и в течение заданного периода времени. Определенную сложность в разработке данного подхода представляет фенотипическая и функциональная гетерогенность опухоли (большинство клеточно-специфичных наночастиц нацелены на единственный рецептор), а также различная у разных пациентов способность онкогенных клеток экспрессировать маркеры [209]. Кроме того, на поверхности опухолевой клетки должно иметься достаточное количество мишени (сверхэкспрессия) для обеспечения прочного взаимодействия с ней нацеленных наночастиц и обеспечения фармакологического эффекта [350]. Также необходимо учитывать возможность неравномерного распределения рецепторов или изменения их экспрессии с течением времени, а также наличие идентичных рецепторов на здоровых клетках [187, 227, 268]. При этом необходимо учитывать, что способ конъюгации лиганда и выбор лиганда, которые также вносят вклад в эффективность активно нацеленной системы доставки [97].

Таким образом, на эффективность нацеливания наночастиц влияет целый ряд факторов, среди которых можно выделить способ синтеза наночастиц, их физико-химические характеристики (определяющие фармакокинетические параметры системы доставки и его биологические эффекты), покрытие наночастиц и его характеристики, способ конъюгации лиганда, профиль высвобождения препарата и т.д.

На сегодняшний день отдельные цитостатические нанопрепараты с активным нацеливанием проходят клинические испытания [46], однако одобренных к применению в клинических условиях препаратов до сих пор нет.

### **1.5 - Концепция магнитоуправляемой доставки химиотерапевтических препаратов**

Перспективным направлением в разработке способов активного таргетирования цитостатиков является управление перемещением в организме комплекса «наноразмерный носитель + цитостатик» с помощью внешних воздействий. На этом принципе основан способ магнитного нацеливания лекарств, концепция которого была предложена ещё в 1981 году [341]. Стратегия магнитного нацеливания подразумевает направленную доставку химиотерапевтических препаратов, ассоциированных с наночастицами с магнитными характеристиками, с помощью внешнего магнитного поля, сфокусированного на участке локализации патологического процесса.

На сегодняшний день синтезирован широкий спектр наночастиц, обладающих магнитными свойствами и способных выступить в качестве средства магнитоуправляемого транспорта: на основе металлов  $MgFe_2O_4$ ,  $CoFe_2O_4$ ,  $MnFe_2O_4$ ,  $LiFe_5O_8$ , а также  $CoPt$ ,  $FePt$ ,  $MnAl$ ,  $SmCo_5$ ,  $Fe_{14}Nd_2B$  [210].

Ввиду наибольшей изученности, относительно низкой токсичности, стабильности магнитных характеристик, а также относительной простоты их синтеза наибольший интерес представляют наночастицы оксида железа (магнетит ( $Fe_3O_4$ ), гематит ( $\alpha-Fe_2O_3$ ) и маггемит ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) [287, 311].

При реализации стратегии магнитоуправляемой доставки химиотерапевтических препаратов наноразмерные частицы с магнитными характеристиками могут либо входить в состав композитов (т.е. входить в состав лекарственной формы в виде наполнителя), либо непосредственно использоваться в качестве платформы для присоединения препаратов. И в том,

и в другом случаях именно присутствие магнитных наночастиц в составе лекарственной формы обуславливает ее магнитные свойства.

Таким образом, современная концепция магнитоуправляемой доставки цитостатиков включает контролируемое высвобождение химиотерапевтических препаратов из системы, содержащей магнитные наночастицы, при воздействии переменного или статического магнитного поля, а также магнитное нацеливание посредством управления перемещением в организме магнитных наночастиц, ассоциированных с препаратом, с помощью приложенного магнитного поля. В работе, посвященной оценке биораспределения магнитолипосом на основе наночастиц магнетита в опухоли и органах мышей с карциномой Льюис в условиях наличия и отсутствия магнитного поля [20], было показано, что в условиях наличия внешнего магнитного поля в участке локализации опухоли обеспечивается целевое накопление магнитолипосом в участке интереса.

Существует возможность расширения спектра оказываемых воздействий магнитоуправляемой системы доставки за счет использования свойств магнитных наночастиц, с одновременным использованием возможности их применения для локальной гипертермии, а также в качестве диагностических агентов, компьютерной томографии, магнитоакустической томографии [57, 60, 202, 260, 270, 279]. Такое сочетание воздействий позволяет не только повысить эффективность лечения, но и обеспечить возможность мониторинга эффективности лечения.

Высоким потенциалом характеризуется подход к созданию магнитоуправляемых систем доставки, включающий интеграцию липосом и магнитных наночастиц [81, 193, 203]. Магнитолипосомы представляют собой фосфолипидные везикулы, в которых магнитные наночастицы либо инкапсулированы во внутренней фазе липосом вместе с химиотерапевтическим препаратом, либо включены в липидный бислой липосом. При этом наличие магнитных наночастиц позволяет целенаправленно высвободить препарат в опухоли под действием внешнего

магнитного поля. В работе [343] было показано, что профиль высвобождения препарата зависит от способа интеграции магнитных наночастиц в липосомы. Также продемонстрировано, что магнитолипосомы обладают высокой биосовместимостью, не вызывая токсических эффектов, при этом в условиях воздействия магнитным полем удается обеспечивать контролируемое высвобождение препарата [81, 193]. В рамках создания тераностических агентов на основе магнитолипосом разрабатываются системы, позволяющие сочетать адресность доставки цитостатика и гипертермическое воздействие [195, 331].

Недостатками липосом являются их низкая термодинамическая стабильность, проницаемость для полярных молекул, ограниченная ёмкость, а также ограничение по количественному включению в состав липосомальной лекарственной формы магнитных наночастиц и химиотерапевтического препарата [266].

Также для магнитного нацеливания предложены магнитные микропузырьки, представляющие собой композит микропузырьков и магнитных наночастиц оксида железа, обеспечивающие магнитную чувствительность микропузырьков, т.е. микропузырьки обладают чувствительностью к ультразвуку и магнитным полям. Было показано, что [78] магнитные пузырьки обладают выраженной магнитной и акустической активностью, а также способны циркулировать в кровотоке и избегать осаждения в легочных капиллярах.

Магнитные волокна, состоящие из полимерной биосовместимой матрицы, содержащие в своем составе магнитные наночастицы и химиотерапевтический препарат, также представляют собой интересный подход к созданию магнитоуправляемых систем [42]. Показано, что данный подход также применим для сочетания различных эффектов – адресность доставки и гипертермическое воздействие [42]. Также продемонстрировано, что с помощью магнитного поля существует возможность обеспечивать контролируемое высвобождение из магнитных волокон препарата [256].

Магнитные многослойные микрокапсулы представляют послойно нанесенные положительно и отрицательно заряженные полиэлектролиты на поверхность магнитных наночастиц [239]. Поверхность полиэлектролитных микрокапсул содержит функциональные группы для дальнейшей функционализации. На сегодняшний день накоплено большое количество данных, свидетельствующих об эффективности многослойных капсул, способных реагировать на ряд раздражителей, включая температуру, pH [333].

Конъюгирование молекул лекарственного препарата с поверхностью магнитных наночастиц также является многообещающим направлением в разработках систем магнитоуправляемого транспорта цитостатиков. Для этого их поверхность наночастиц модифицируют посредством нанесения биосовместимой оболочки (выступающей как спейсер для связывания фармацевтических веществ с магнитной наночастицей). Такой подход позволяет не только обеспечивать контроль высвобождения цитостатика (за счет его высвобождения со скоростью, определяемой деградацией оболочки), но и обеспечить их агрегативную устойчивость, а также снизить потенциальную токсичность [80, 226].

## **1.6 - Заключение по обзору литературы**

Наноразмерные частицы оксида железа (МНЧ), являясь наиболее изученным типом магнитных наночастиц, представляют собой перспективные агенты для применения в областях диагностики и лечения различных заболеваний, адресной доставки лекарств. Несмотря на широкие перспективы использования данного вида наночастиц для решения различных биомедицинских задач (адресная доставка лекарств к участку патологического процесса, диагностика, непосредственное терапевтическое воздействие), наибольший интерес МНЧ представляют для использования в онкологии. Данный факт обусловлен многофункциональностью наночастиц: возможностью управления их перемещением в организме под воздействием

магнитного поля, их локального нагрева, использования наночастиц в качестве диагностических агентов. Существует также возможность одновременного сочетания указанных свойств, что определяет МНЧ в качестве перспективных тераностических агентов. Однако, большая площадь поверхности МНЧ в сочетании с их повышенной реакционной способностью может обуславливать токсические эффекты, которые в значительной степени определяются характеристиками наночастиц (такие как их размер, форма, химические свойства поверхности и т.д.), зависящими от способа их получения, наличия/отсутствия оболочки и ее качественного состава. Это определяет необходимость оптимизации процесса синтеза на самых ранних стадиях проектирования наночастиц, отталкиваясь от желаемого результата в части их биологических свойств, а также профиля их безопасности. Несмотря на то, что на сегодняшний день в литературе представлено множество работ, посвященных исследованию биосовместимости МНЧ и оценке перспектив их использования для решения различных биомедицинских задач, лишь отдельные лекарственные формы на основе наночастиц оксида железа используются в клинической практике. Данный факт в значительной степени обусловлен отсутствием сформированного однозначного представления о механизмах, лежащих в основе взаимодействия МНЧ с биологическими объектами различного уровня (клетками, тканями, организма в целом), а также сложностью в обосновании и подтверждении концепции использования МНЧ в качестве тераностических агентов.

## ГЛАВА 2 - МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты на животных выполнены с учетом международных правил и рекомендаций (Council of Europe 2006. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123); The European Parliament and the Council of the European Union 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes; FELASA guidelines), подтвержденных Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных Центра Алмазова (номер протокола-заявки 17-1 от 06.03.2017). Животные содержались в условиях вивария при стандартном свето-темновом режиме со свободным доступом к воде и пище. Эксперименты с использованием крови человека, полученной от некурящих мужчин в возрасте 20–35 лет, проведены в соответствии с Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2013 ред.). Этапы исследования отражены на схеме 1.

### **Ранний скрининг биосовместимости немодифицированных МНЧ** (in vitro - эндотелиоциты, in vivo - крысы)

Цель – определить виды МНЧ, обладающие наименьшими повреждающими эффектами



### **Сравнительное исследование патофизиологических механизмов действия выбранных видов МНЧ**

- Гемолиз эритроцитов
- Генерация клетками крови АФК
- Системные эффекты одно- и многократного в/в введения
- Влияние в/в введения на функциональную активность эндотелия
- Влияние в/в введения в условиях воздействия магнитного поля на гемодинамические параметры

Цель – на основании суммации данных об эффектах определить вид МНЧ, обладающий лучшим профилем биосовместимости для использования его в качестве средства адресной доставки лекарств



### **Модификация поверхности выбранного вида МНЧ и исследование биосовместимости**

- Исследование токсических эффектов
- Влияние в/в введения на функциональную активность эндотелия
- Генерация клетками крови АФК

Цель – определить виды модифицированных МНЧ, обладающие наименьшими токсическими эффектами



### **Обоснование возможности магнитоуправляемой доставки лекарств с помощью МНЧ** (стендовые условия, in vivo)

## Схема 1 – Этапы исследования

## 2.1 - Используемые в работе объекты исследования

В таблице 1 представлены объекты исследования с соотношением их с решением поставленных задач.

### 2.1.1 - Синтез немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа

В исследованиях использовали экспериментальные образцы наночастиц, полученные в НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» Минздрава России с использованием модифицированного реактора идеального смешения периодического действия емкостью резервуара 2000 мл (УНСЧЕМ, Китай) (рисунки 1). Для приготовления всех видов МНЧ использовались реактивы Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).



Рисунок 1 - Реактор для синтеза магнитных наночастиц



Таблица 1 - Используемые в работе объекты исследования

Вид наночастиц/ обозначение по тексту	Экспериментальные работы
Наночастицы магнетита/МНЧ1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Исследование влияния МНЧ на морфологию и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека (культура HUVEC).</li> <li>- Количественная оценка показателей периферической крови крыс при однократном внутривенном введении МНЧ.</li> <li>- Исследование влияния МНЧ в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз и агрегацию эритроцитов, продукцию АФК.</li> <li>- Исследование влияния МНЧ на сократительную и релаксационную функции артерий.</li> <li>- Исследование влияния внутривенного введения МНЧ на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока.</li> <li>- Исследование органного распределения МНЧ.</li> <li>- Исследование системных эффектов одно- и многократного внутривенного введения крысам МНЧ.</li> <li>- Исследование влияния МНЧ на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> при наличии внешнего магнитного поля.</li> <li>- Экспериментальное подтверждение возможности использования МНЧ для их магнитоуправляемой доставки в ткань (<i>ex vivo</i>)</li> </ul>

Композитные наночастицы оксида железа с оболочкой из диоксида кремния/МНЧ2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Исследование влияния МНЧ на морфологию и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека (культура HUVEC).</li> <li>- Количественная оценка показателей периферической крови крыс при однократном внутривенном введении МНЧ.</li> <li>- Исследование влияния МНЧ в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз и агрегацию эритроцитов, продукцию АФК.</li> <li>- Исследование влияния МНЧ на сократительную и релаксационную функции артерий.</li> <li>- Исследование влияния внутривенного введения МНЧ на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока.</li> <li>- Исследование органного распределения МНЧ.</li> <li>- Исследование системных эффектов одно- и многократного внутривенного введения крысам МНЧ.</li> <li>- Исследование влияния МНЧ на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> при наличии внешнего магнитного поля.</li> </ul>
Композитные наночастицы оксида железа с ядром из диоксида кремния/МНЧ3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Исследование влияния МНЧ на морфологию и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека (культура HUVEC).</li> <li>- Количественная оценка показателей периферической крови крыс при однократном внутривенном введении МНЧ.</li> </ul>
Наночастицы магнетита с оболочками на основе полиэфира молочной кислоты (полилактида)/МНЧ+полилактид	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Исследование морфофункционального состояния сосудов в условиях однократного внутривенного введения крысам модифицированных различными оболочками МНЧ.</li> <li>- Исследование токсических эффектов МНЧ при их однократном внутривенном введении крысам.</li> <li>- Анализ влияния покрытых оболочками МНЧ на генерацию АФК при инкубации с кровью человека.</li> <li>- Анализ влияния МНЧ, покрытых оболочкой из полилактида, на генерацию АФК в условиях индуцированного окислительного стресса.</li> </ul>

Продолжение таблицы 1

<p>Наночастицы магнетита с оболочками на основе поликонденсированной глюкозы/ МНЧ+ полисахарид</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Исследование морфофункционального состояния сосудов в условиях однократного внутривенного введения крысам модифицированных различными оболочками МНЧ.</li> <li>- Исследование токсических эффектов МНЧ при их однократном внутривенном введении крысам.</li> <li>- Анализ влияния покрытых оболочками МНЧ на генерацию АФК при инкубации с кровью человека.</li> </ul>
<p>Наночастицы магнетита с оболочками на основе альбумина/ МНЧ+альбумин</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Исследование морфофункционального состояния сосудов в условиях однократного внутривенного введения крысам модифицированных различными оболочками МНЧ.</li> <li>- Исследование токсических эффектов МНЧ при их однократном внутривенном введении крысам.</li> <li>- Анализ влияния покрытых оболочками МНЧ на генерацию АФК при инкубации с кровью человека.</li> </ul>
<p>Наночастицы магнетита с оболочками на основе полиэфира молочной кислоты (полилактида) с включенным в состав оболочки флуоресцентным агентом-индоцианином зеленым/ ИЦЗ-МНЧ</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Экспериментальное подтверждение возможности использования МНЧ для их магнитоуправляемой доставки в опухоль (in vivo).</li> </ul>

## Синтез наночастиц магнетита

Для получения наночастиц магнетита (МНЧ1) к раствору, содержащему смесь сульфатов железа (II), железа (III) (мольное соотношение 2:1, объем 700 мл), добавляли смесь 25% раствора гидроксида аммония и 1% раствора ацетата аммония (отношение железа и ацетата аммония составляло 2:1:0,1) при постоянном перемешивании со скоростью 4 мл/мин. Синтез проводили до визуализации насыщенно черной окраски и установления значения pH=8–9. После этого полученный коллоидный продукт отделяли с помощью центрифугирования и четырехкратно промывали дистиллированной водой. Далее полученные МНЧ отфильтровывались и подвергались лиофильной сушке при  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 суток. Приготовление раствора наночастиц в физиологическом растворе (NaCl 0,9%, ФР) осуществлялось на ультразвуковом диспергаторе УЗД-2 (ФГУП НИИ ТВЧ, Россия) в течение 5 минут (рисунки 2).

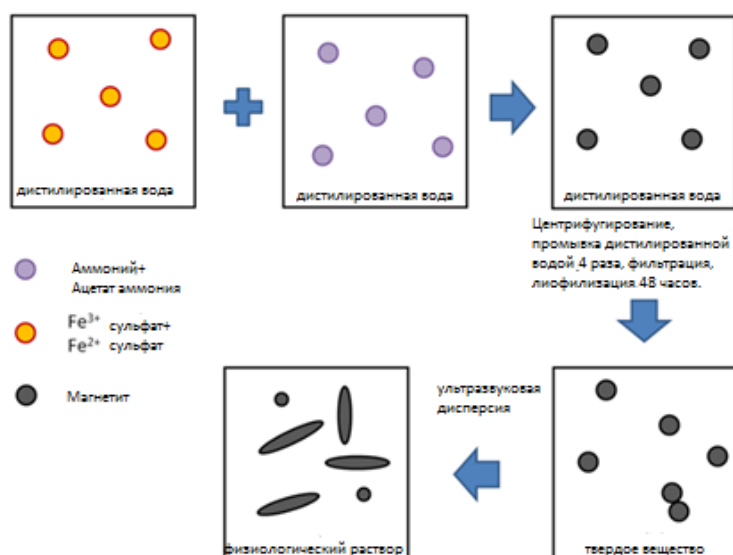


Рисунок 2 – Этапы синтеза наночастиц магнетита

### **Синтез композитных наночастиц на основе оксида железа и диоксида кремния**

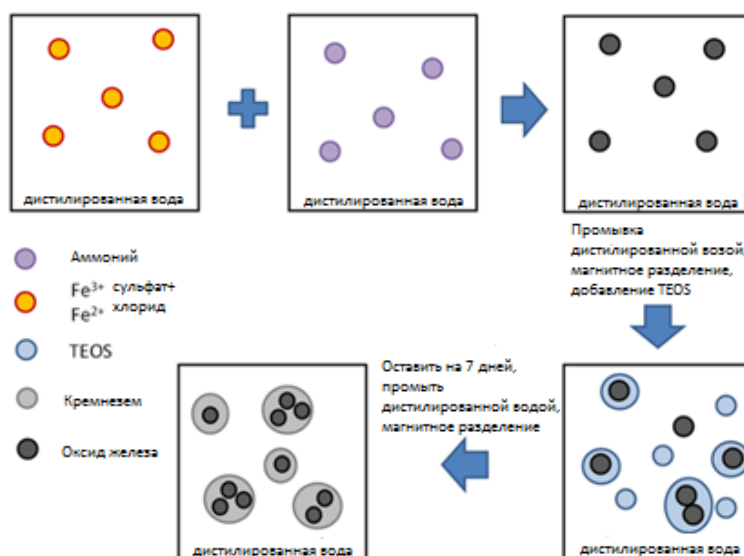
Композитные наночастицы оксида железа и диоксида кремния  $Fe_mO_n-SiO_2$  синтезировали различными способами, позволяющими обеспечить в зависимости от способа формирования наночастиц с оболочкой, либо с ядром из диоксида кремния.

### **Синтез композитных наночастиц оксида железа с оболочкой из диоксида кремния**

Синтез композитных наночастиц оксида железа с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2) осуществляли методом соосаждения (рисунок 3), включающим следующие технологические операции:

- подготовка водного раствора солей железа ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  и  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ );
- добавление водного раствора аммиака для осаждения оксида железа ( $Fe_3O_4$  и  $\gamma-Fe_2O_3$ );
- добавление тетраэтилортосиликата (ТЭОС);

Через 7 дней осуществляли отделение наночастиц магнитным осаждением, после чего проводили пятикратную промывку дистиллированной водой ( $H_2O_{дист}$ ) ресуспендирование в стерильном ФР и осуществляли обработку ультразвуком непосредственно перед использованием.



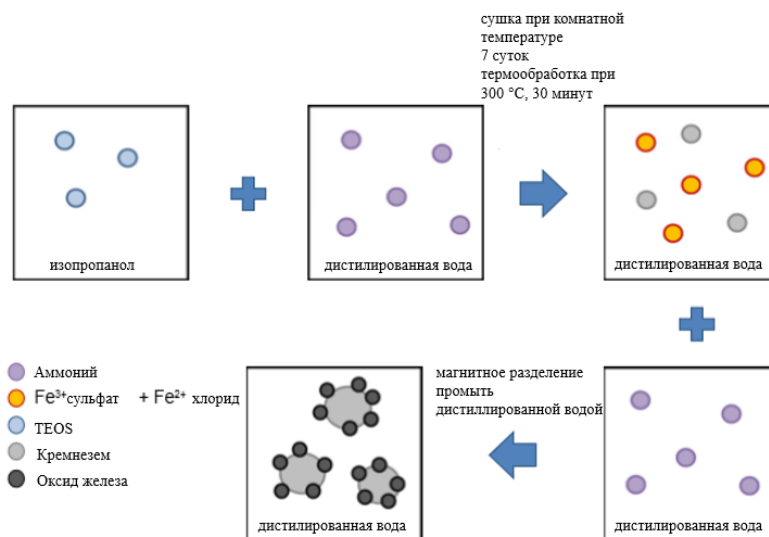
**Рисунок 3 - Этапы синтеза композитных наночастиц оксида железа с оболочкой из диоксида кремния**

### **Синтез композитных наночастиц оксида железа с ядром из диоксида кремния**

Процесс получения композитных наночастиц оксида железа с ядром из диоксида кремния (МНЧЗ) включал следующие технологические процессы (рисунок 4):

- приготовление раствора ТЭОС на основе изопропилового спирта;
- добавление водного раствора аммиака;
- сушка при комнатной температуре для удаления растворителя в течение 7 суток;
- термообработка при 300 °С в течение 30 минут;
- добавление к водному раствору солей железа (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O и FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O);
- ультразвуковое диспергирование порошка SiO<sub>2</sub> в растворе солей;
- добавление водного раствора аммиака для осаждения оксида железа (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>);

Затем осуществляли выделение наночастиц магнитным осаждением, промывку  $H_2O_{\text{дист}}$  и осуществляли обработку ультразвуком непосредственно перед использованием.



**Рисунок 4 - Этапы синтеза композитных наночастиц оксида железа с ядром из диоксида кремния**

### 2.1.2 - Синтез наночастиц магнетита с модифицированной поверхностью

Синтезировали наночастицы магнетита с оболочками на основе сложного полиэфира молочной кислоты (полилактида), на основе поликонденсированной глюкозы и на основе сывороточного альбумина. Данные полимеры характеризуются их изученностью, относительно высокой степенью их биосовместимости, биоразлагаемостью, что позволяет их рассматривать в качестве пригодных к использованию в медицинских целях, включая применение в качестве средства адресной доставки лекарств за счет включения последних в состав полимерной оболочки [96, 347, 351].

### **Синтез наночастиц магнетита с оболочкой на основе полилактида (-D, L)**

Для синтеза наночастиц магнетита с оболочкой на основе из полилактида (МНЧ+полилактид) к 200 мг наночастиц магнетита добавляли 2 мл раствора полилактида-D,L в хлороформе с концентрацией 0,1 г/мл. Полученную суспензию перемешивали 30 минут с частотой  $300\text{мин}^{-1}$  с помощью шейкера LS-220 (LOIP, Россия). Затем троекратно промывали с магнитной сепарацией (на первой и второй промывке использовали хлороформ или изопропиловый спирт). При использовании изопропилового спирта его добавление в суспензию производили при постоянном ультразвуковом воздействии длительностью 5–10 минут с использованием ультразвукового диспергатора УЗД-2 (ФГУП НИИ ТВЧ, Россия). После третьей промывки изопропиловым спиртом полученный осадок ретидиспергировали в  $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$ , замораживали и лиофилизировали при температуре  $-50^\circ\text{C}$  и давлении 30 Па в течение 48 ч на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

### **Синтез наночастиц магнетита с оболочкой из полисахаридов**

Для синтеза наночастиц магнетита с оболочкой из полисахаридов нанесение оболочки осуществляли гидротермальным методом. Суспензию наночастиц магнетита в течение 1 суток обрабатывали насыщенным водным раствором глюкозы при повышенном давлении до 50 МПа. После этого осуществляли перемешивание суспензии с помощью шейкера LS-220 (LOIP, Россия) в течение 30 минут с частотой  $300\text{мин}^{-1}$ . Полученный объем образца доводили до 15 мл посредством добавления  $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$  и загружали в стальной миниавтоклав с вкладышем из политетрафторэтилена КН-25 (КНР). Полученные МНЧ промывали  $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$  троекратно с магнитной сепарацией. После этого осадок замораживали и лиофилизировали при  $-50^\circ\text{C}$  и давлении



30 Па в течение 2 суток на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США). . Поскольку глюкоза обладает несколькими реакционными центрами, то в результате образуется сложный по составу разветвленный глюкан. Продукт реакции подробно не изучался, что обусловило использование для обозначения данного вида наночастиц формулировки «МНЧ+полисахарид».

### **Синтез наночастиц магнетита с оболочкой из альбумина**

Для синтеза наночастиц магнетита с оболочкой из альбумина (МНЧ+альбумин) к 50 мг наночастиц магнетита добавляли 1 мл водного раствора альбумина человека с концентрацией 0,2 г/мл. Полученную суспензию перемешивали с помощью шейкера LS-220 (LOIP, Россия) в течение 30 минут с частотой 300 мин<sup>-1</sup>. После этого осадок троекратно промывали H<sub>2</sub>O<sub>дист</sub> с магнитной сепарацией, замораживали и лиофилизировали при -50°C и давлении 30 Па в течение 2 суток на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

### **Синтез наночастиц магнетита с оболочкой на основе полилактида с включенным в состав оболочки флуоресцентным агентом-индоцианином зеленым**

В рамках синтеза наночастиц магнетита с оболочкой на основе полилактида с включенным в состав оболочки индоцианина зеленого (ИЦЗ-МНЧ) обеспечивали получение конъюгата «полилактид+индоцианин». Для этого использовали порошок, представляющий собой рацематическую смесь полилактида-D,L, молекулярной массой 60 KDa. К 2 мл раствора полилактида в хлороформе концентрацией 0,1 г/мл добавляли 20-кратный мольный избыток этилендиамина и 20-кратный мольный избыток 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид. Синтез проводили в полипропиленовой пробирке объемом 15 мл, на шейкере при частоте перемешивания 300 min<sup>-1</sup> в

течение 2 часов. По окончании синтеза раствор центрифугировали от избытка выпавших в осадок производных полиэтилена в течение 5 минут на скорости  $3000 \text{ min}^{-1}$ . Затем к 2 мл раствора добавляли 2 мл раствора индоцианина зеленого в диметилсульфоксиде, концентрацией 0,5 мг/мл. Иммуобилизацию осуществляли на шейкере в течение 2 часов при скорости перемешивания  $300 \text{ мин}^{-1}$ .

После данных манипуляций осуществляли нанесение оболочки полученного конъюгата на наночастицы магнетита:

К 200 мг наночастиц магнетита добавляли 4 мл конъюгата. После этого суспензию перемешивали с использованием шейкера LS-220 (LOIP, Россия) в течение 30 мин с частотой  $300 \text{ min}^{-1}$ . После этого проводили трехкратную промывку с магнитной сепарацией с использованием в качестве дисперсной среды изопропилового спирта. Добавление изопропилового спирта в суспензию осуществляли при постоянном ультразвуковом воздействии длительностью 5–10 мин с использованием ультразвукового диспергатора УЗД-2 (ФГУП НИИ ТВЧ, Россия). После третьей промывки изопропиловым спиртом полученный осадок промывали  $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$  и ресуспендировали в стерильном ФР в концентрации 2 мг/мл.

## **2.2 - Определение физико-химических характеристик наночастиц оксида железа**

Размер, форму и морфологию МНЧ оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), (ТЕМ; JEM-2010, JEOL, Токио, Япония). Распределение МНЧ по размерам изучалось с использованием прибора Zetasizer Nano (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Вустершир, Великобритания) методом динамического рассеяния света (динамическое светорассеяние, фотонная корреляционная спектроскопия) с использованием технологии NIBS (неинвазивного обратного рассеяния). Статические магнитные свойства МНЧ изучали с помощью

вибрационного магнитометра «Lake Shore 7410» (Lake Shore 7410, Lake Shore Cryotronics Inc., Westerville, OH, USA) в воздушной среде при стандартной температуре. Оптические свойства МНЧ в среднем и дальнем инфракрасном диапазоне изучали методом Фурье-спектроскопии с использованием прибора Nicolet 6700 (NICOLET 6700, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Дополнительное (кроме ПЭМ) подтверждение формирования оболочки из полилактида-D,L производили методом термогравиметрического анализа в диапазоне температур 26–750 °С с использованием прибора для термических испытаний материалов SETSYS Evolution 1750 CS (Setaram, Франция). Анализ элементного состава полученных МНЧ выполнен с использованием энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного спектрометра EDX 800 HS (Shimadzu, Япония). Анализ магнитных характеристик МНЧ до нанесения оболочки выполнен методом вибрационной магнитометрии с помощью прибора Lake Shore 7410 («Lake Shore Cryotronics Inc.», США). Электрокинетический потенциал модифицированных наночастиц исследовали при помощи высокоэффективного двухуглового анализатора размеров части ZetaSizer Nano.

### **2.3 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на морфологию и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека (культура HUVEC)**

Эксперименты в условиях *in vitro* проводили на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC). HUVEC выделяли согласно адаптированному протоколу [33]. Последующее культивирование клеток проводили с использованием наборов Endothelial Cell Cultur Medium Kit (BD Bioscience, США).

## Культивирование эндотелиальных клеток человека с магнитными наночастицами оксида железа

Клетки высевали с плотностью  $5 \times 10^3 / \text{см}^2$  на желатинизированные планшеты (0,2% желатина в фосфатно-солевом буферном растворе) в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора при  $37^\circ\text{C}$  (5%  $\text{CO}_2$ ) в 12-луночной планшете для выявления жизнеспособных клеток. Каждая лунка содержала приблизительно  $100 \times 10^3$  клеток в 100 мкл культуральной среды. Все эксперименты проводились в трехкратных повторах. В лунки вносили 0,1, 1,0, 10,0 мкл МНЧ1 или МНЧ2 или МНЧ3, что соответствовало дозе 0,7, 7,0 и 70,0 мкг МНЧ /на лунку (таблица 2). Максимальная доза была подобрана в пилотном эксперименте как доза, позволяющая визуализировать клетки. В контрольные лунки добавляли соответствующий объем ФР для каждой концентрации.

**Таблица 2 – Характеристика экспериментальных групп с указанием вида наночастиц**

Группа (n)	Доза МНЧ, мкг/лунка		
МНЧ1 (n=9)	0,7	7,0	70,0
МНЧ2 (n=9)	0,7	7,0	70,0
МНЧ3 (n=9)	0,7	7,0	70,0
ФР (n=9)	Эквивалентный объем		

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния; ФР – физиологический раствор. n- количество экспериментов.

## Визуальный контроль морфологических изменений клеток эндотелиальных клеток человека в условиях культивирования с магнитными наночастицами оксида железа

Визуальный контроль клеток осуществляли на инвертированном микроскопе AxioStar Carl Zeiss (Германия) при прямой и фазово-контрастной

микроскопии (ув.  $\times 50$ ) через 48 часов культивации. Исследовали морфологические изменения клеток, а также осуществляли подсчет двуядерных клеток после 48 часов культивирования с исследуемыми образцами. Анализ клеток и подсчет количества двуядерных клеток проводили для каждого образца в 5 случайных полях зрения для каждого образца с последующим подсчетом среднего значения.

### **Определение размера и гранулярности клеток эндотелиальных клеток человека в условиях культивирования с магнитными наночастицами оксида железа**

Размер и гранулярность клеток оценивали после 48 часов сокультивации методом проточной цитометрии на проточном лазерном цитометре Guava EasyCyte 8 (Milipore) по прямому и боковому малоугловому светорассеянию в линейных шкалах до достижения количества целевых событий 7000.

### **2.4 - Количественная оценка показателей периферической крови крыс при однократном внутривенном введении магнитных наночастиц оксида железа**

Конечная концентрация всех трех типов МНЧ в растворе составляла 0,7 мг/мл. За 12 ч до начала эксперимента животные подвергались пищевой депривации без ограничения доступа к питьевой воде.

МНЧ вводили в латеральную вену хвоста самцов крыс стока Wistar (масса 240-270 гр) при помощи одноразовых катетеров (катетер внутривенный (браунюля) Вазофикс Церто, 24G, 50 мм, Braun, Германия). Осуществляли фиксацию животных (рестрейнер), затем разогревали место вкола, протирая дезинфицирующим раствором («Стеризол»). Введение МНЧ осуществляли со скоростью 1 мл/мин. Концентрация наночастиц была определена как

содержащая максимально возможное их количество, не вызывающее при болюсном введении крысам механической закупорки сосуда.

Объем введения не превышал максимально допустимые значения для лабораторных животных [27] и составил 1 мл.

Животные случайным образом были разделены на экспериментальные группы в зависимости от типа исследуемого агента (таблица 3). Контролем служила группа с введением стерильного ФР.

**Таблица 3 - Характеристика экспериментальных групп с указанием доз и вида наночастиц**

Группа животных (n)	Концентрация МНЧ, мг/мл /доза, мг/животное
МНЧ1 (n=15)	0,7/ 0,7
МНЧ2 (n=15)	0,7/ 0,7
МНЧ3 (n=15)	0,7/ 0,7
ФР (n=15)	Эквивалентный объем

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния; ФР – физиологический раствор.

Взятие крови для гематологического анализа осуществляли из десны через 3, 6 и 24 ч после введения исследуемых агентов. Кровь забирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДКТК<sub>3</sub>) в объеме 250 мкл. Исследование проводили с помощью автоматического гематологического анализатора URIT – 3000 (URIT Medical Electronic Group Co., Ltd; КНР). Определяли следующие параметры крови: содержание лейкоцитов (WBC, Г/л), фракции лейкоцитов: гранулоциты (Gr, %), лимфоциты (Lym, %), моноциты (Mi, %), количество эритроцитов (RBC,  $\times 10^{12}/л$ ), тромбоцитов (PLT,  $10 \times 10^9/л$ ), содержание гемоглобина (Hb, г/л), эритроцитарные индексы: среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, pg), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC, г/л), средний объем эритроцитов (MCV, fl), гематокрит (Hct, %).

## 2.5 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз и агрегацию эритроцитов и продукцию активных форм кислорода

Исследовали МНЧ в концентрациях 0,2; 2,0 и 20,0 мг/мл (таблица 4). Объем выборки в каждой из исследуемых групп составил 8 образцов.

**Таблица 4 - Характеристика экспериментальных групп с указанием доз и видов наночастиц**

Группа (n)	Доза МНЧ, мг/мл		
МНЧ1 (n=8)	0,2	2,0	20,0
МНЧ2 (n=8)	0,2	2,0	20,0
ФР (n=8)	Эквивалентный объем		

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; ФР – физиологический раствор. n - количество экспериментов.

Исследование проводили на гепаринизированной цельной крови человека, для чего готовили инкубационную взвесь: к 1 мл крови при постоянном перемешивании добавляли 1 мл раствора МНЧ. Максимальная доза наночастиц соответствовала дозе, которая не вызывала гемолиз эритроцитов в течение 1 часа.

Полученную взвесь инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании на возвратно-поступательном шейкере (Heidolph, Германия) при 200 об/мин. Контролем служили образцы крови с добавлением эквивалентного объема стерильного ФР.

Регистрацию исследуемых показателей осуществляли непосредственно после добавления МНЧ/ФР к образцам крови (исходный уровень), а также через 1 час, 2,5 часа и 5 часов инкубации при постоянном перемешивании (200 об/мин). Регистрацию изучаемых параметров в каждом образце на каждой дискретной точке осуществляли в трехкратных повторах.

### **Оценка генерации активных форм кислорода**

Детекцию генерации активных форм кислорода детектировали с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) на хемилюминометре Lum-5773 (ДИСофт, Россия). Для измерения ХЛ каждого образца к 200 мкл инкубационной взвеси добавляли 600 мкл раствора Хэнкса и 200 мкл раствора люминола, приготовленного добавлением 200 мкл DMSO к твердому люминолу (0,002 г) и доведенного до 10 мл дистиллированной водой. В течение 10 минут после введения люминола регистрировали максимальную интенсивность ( $I_{\max}$ ) и полную светосумму (S) свечения за данный промежуток времени. Из регистрируемых значений хемилюминесценции вычитали фоновое свечение хемилюминометра.

### **Исследование спонтанной агрегации эритроцитов цельной крови**

Непосредственно перед проведением исследования под дно пробирки на 3 минуты устанавливали постоянный магнит для изоляции МНЧ из взвеси. Анализ производили на эритроцитах, осевших за 3 минуты из нижнего слоя. Для каждого образца вычисляли индекс агрегации эритроцитов (ИАЭ, число агрегатов к количеству свободных клеток, %), усредняя значения из трех больших квадратов камеры Горяева [7]. В рамках определения ИЭМ осуществлялся подсчет эритроцитов в исследуемых образцах крови на предмет возможного осаждения из взвеси эритроцитов, ассоциированных с наночастицами и изменения их концентрации в инкубационной среде.

### **Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на спонтанный гемолиз**

Для исследования гемолитической активности МНЧ инкубационную взвесь центрифугировали 10 мин при 1600 об/мин. Количество освобождённого гемоглобина определяли на основании определения



оптической плотности полученных супернатантов ( $\lambda = 540$  нм) на спектрофотометре SQ-2802S (UNICO, США).

Коэффициент гемолиза (КГ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КГ, \%} = (\text{ОП}_{\text{оп}} - \text{ОП}_{\text{нк}}) / (\text{ОП}_{\text{пк}} - \text{ОП}_{\text{нк}}) * 100\%, \text{ где} \quad (1)$$

ОП — оптическая плотность ( $\lambda = 540$  нм),

нк — отрицательный контроль,

пк - положительный контроль,

оп — опытный образец.

За положительный контроль принимали образцы со 100%-ным гемолизом, индуцированным добавлением 0,01% раствора додецилсульфата натрия при соотношении образец:реагент 1:10. За отрицательный контроль принимали образец с добавлением физиологического раствора (ФР).

КГ менее 5% являлся свидетельством отсутствия гемолитического эффекта МНЧ [53].

### **Определение качественного состава белкового слоя**

Определение качественного состава белков на поверхности магнитных наночастиц оксида железа (МНЧ) осуществляли на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 8700 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием приставки НПВО (нарушенное полное внутреннее отражение) (диапазон  $4000 \text{ см}^{-1}$  -  $650 \text{ см}^{-1}$ , разрешение  $2 \text{ см}^{-1}$ , 512 сканирований), а также детектора МСТ-А (Thermo Fisher Scientific, США) с рабочей температурой  $77^\circ\text{K}$ . Источником возбуждения служил карбидокремниевый инфракрасный излучатель Globar (Kanthal, Швеция). В качестве фона использовался ФР. Концентрация МНЧ в исследованных образцах составила 2,0 мг/мл.

Контролем служили спектры наночастиц в «чистом виде», для получения которых смешивали 1,5 мг МНЧ с 300 мг бромида калия (характеризующимся спектром поглощения, отличным от спектра химических элементов МНЧ) и готовили пробы в виде таблеток.

## **2.6 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на сократительную и релаксационную функции артерий**

Самцам крыс стока Wistar (масса 250-280 гр) осуществляли однократное внутривенное введение исследуемых агентов в латеральную хвостовую вену как подробно описано в п. 2.4 (таблица 5).

**Таблица 5 – Характеристика экспериментальных групп с указанием используемых доз и видов наночастиц**

Группа животных (n)	Концентрация МНЧ, мг/мл /доза, мг/животное
МНЧ1 (n=4)	0,7 /1,4
МНЧ2 (n=4)	0,7 /1,4
ФР (n=4)	Эквивалентный объем

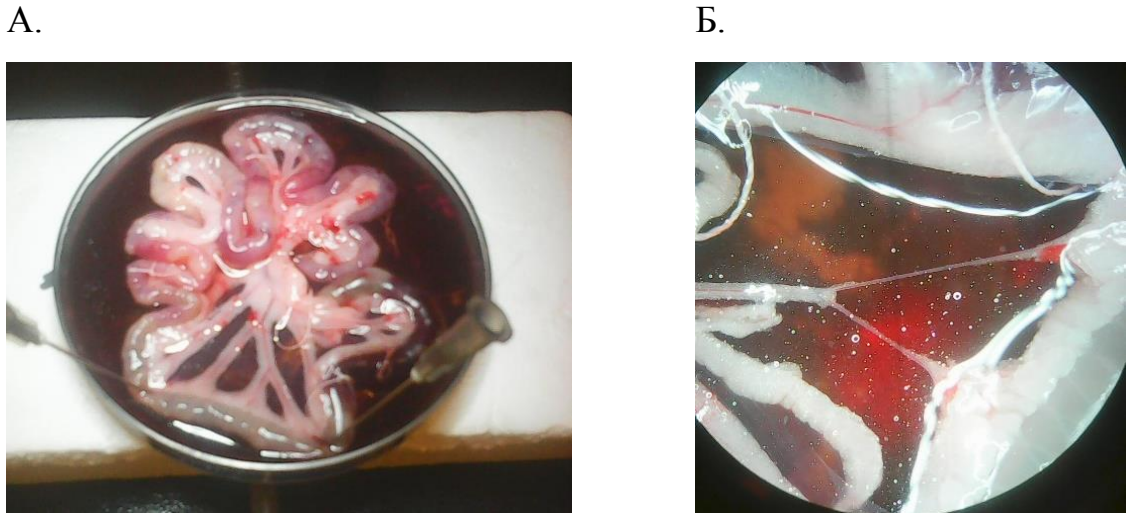
*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; ФР – физиологический раствор.

Объем введения исследуемых агентов составил 2 мл (1,4 мг наночастиц). Контролем служила группа животных с введением эквивалентного объема стерильного ФР.

Оценку сократительной и релаксационной активности эндотелия проводили на проволочном миографе (DMT 620M, Дания).

Через 1 час после введения исследуемых агентов взятие тонкого кишечника с брыжейкой, которые помещали в чашку Петри, заполненную охлажденным раствором Кребса-Хензеляйта (К-Х, [мМ]: NaCl 119,0, KCl 4,7, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,17, CaCl<sub>2</sub> 1,6, MgSO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25,0, глюкоза 5,5, ЭДТА 0,03)

(*рисунок 5А*). Затем производили выделение участков артерий брыжейки 2-3-го порядка длиной 3 мм (*рисунок 5 Б*).



**Рисунок 5 - Подготовка сосудов к исследованию с помощью методики миографии**

*Примечание:* А. Размещение выделенной брыжейки в чашке Петри. Б. Выделенные участки артерий брыжейки.

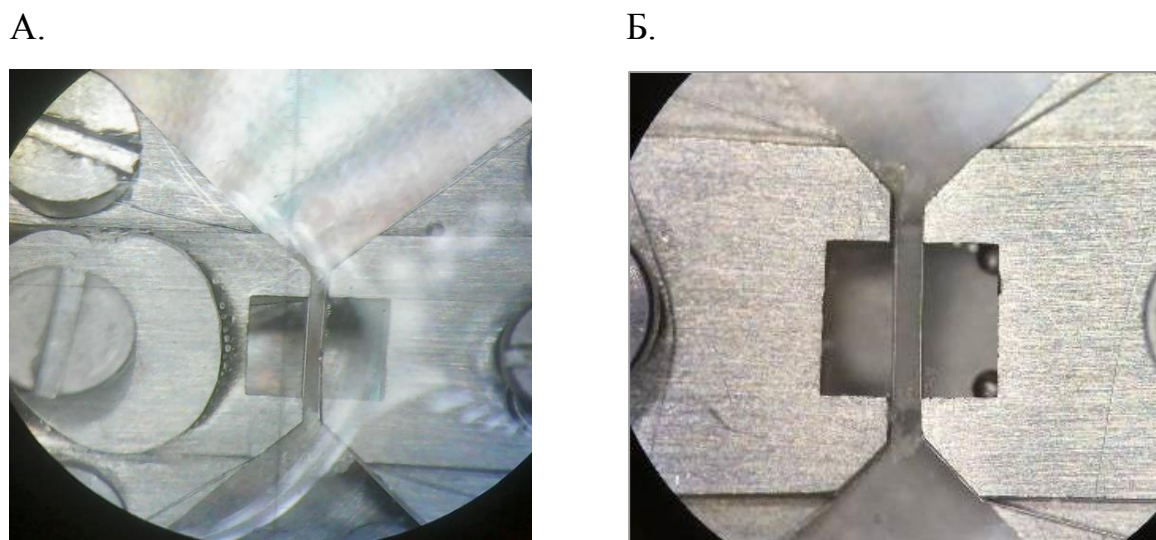
Монтаж сосуда в камере миографа производили при помощи двух стальных проволок диаметром 40 мкм (*рисунок 6 А,Б*). Исследованию подвергали по 3 сосуда от каждого животного (n=12).

После нормализации трансмурального давления осуществляли активацию сократительных механизмов с помощью инкубации в гиперкалиевом физиологическом солевом растворе ([мМ]: NaCl 78,2, KCl 60,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,17,  $\text{CaCl}_2$  1,6,  $\text{MgSO}_4$  1,2,  $\text{NaHCO}_3$  25,0, глюкоза 5,5, ЭДТА 0,03) и 10 мкМ фенилэфрина (ФЭ) с последующей повторной отмывкой раствором Кребса-Хензелята, состав которого указан выше (К-Х).

Для исследования сократительной функции использовали протокол кумулятивного дозозависимого ответа на ФЭ, используемого в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкМ.

Для исследования релаксационной активности сосудов осуществляли предварительное сокращение сосуда с помощью ФЭ на 60% от максимального.

После этого сосуды инкубировали с ацетилхолином (АХ) по аналогичной сократительному ответу схеме до момента полной релаксации или отсутствия дальнейшей реакции [49].



**Рисунок 6 - Монтаж сосудов в камере миографа**

*Примечание:* А. Вид сосуда в камере миографа; Б. Укрупненный вид сосуда в камере миографа, закрепленного с помощью стальных проволок, пропущенных через просвет сосуда.

Вычисляли значение логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа ( $\log EC_{50}$ ) и значение максимальной величины ответа ( $E_{max}$ ).

## **2.7 - Исследование влияния внутривенного введения магнитных наночастиц оксида железа на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока**

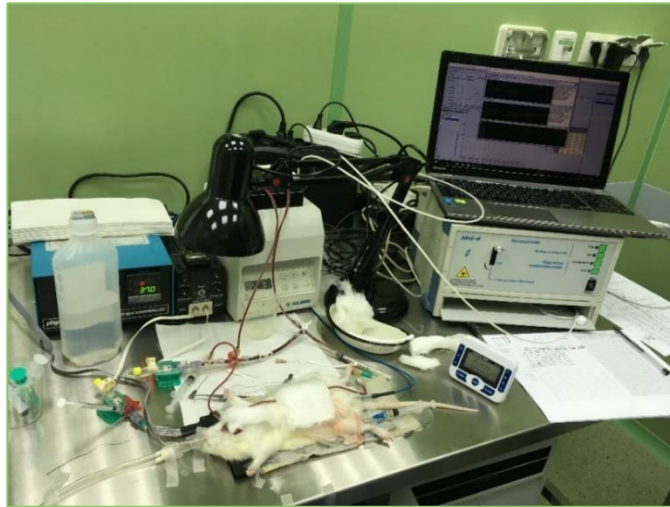
Исследование влияния внутривенного введения магнитных наночастиц оксида железа на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию проводили на крысах, находящихся в условиях

возможности изменения скорости кровотока в задней четверти туловища (рисунки 7 А,Б).

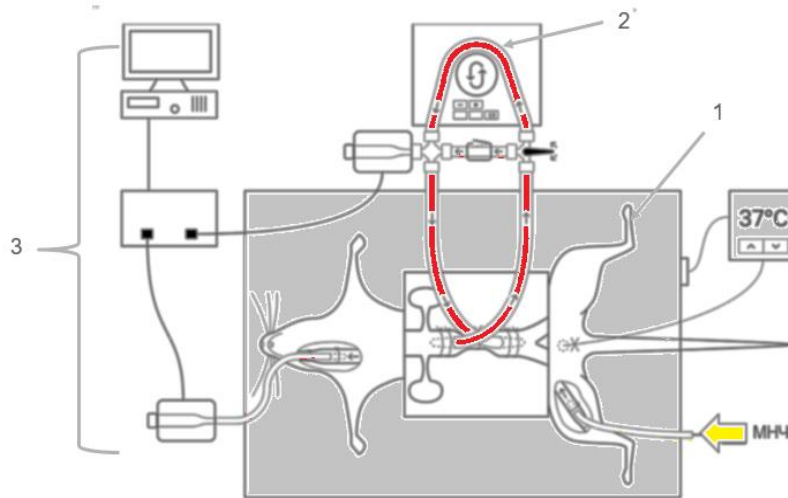
Наркотизированных изофлюраном животных (самцы крыс стока Wistar, массой 350-365 гр, n=10 в каждой группе) после достижения достаточной глубины наркоза (о чем свидетельствовало отсутствие или значительное подавление «роговичного рефлекса», рефлекса на болевой раздражитель (щипок кожи на конечности животного) размещали на нагревательной платформе TCAT-2LV (PHYSITEMP Instruments Inc., США) для поддержания постоянной температуры тела на физиологическом уровне. Затем животным проводили катетеризацию сонной артерии (для регистрации гемодинамических параметров) и правой бедренной вены (для внутривенного введения МНЧ), осуществляли срединный доступ к брюшной аорте.

Внешний контур циркуляции перфузионного насоса роликового типа с регулируемой производительностью Gilson (Gilson Inc., WI, США) заполняли плазмозамещающим средством Гелофузин 6,0% (BjBraun, Германия) в объеме 4 мл с 1500 ЕД/кг гепарина (BjBraun, Германия). Ток крови по брюшной аорте останавливали путем затягивания центральной лигатуры и накладывания сосудистых клемм на дистальный и проксимальный отделы аорты. Через канюли центральный конец брюшной аорты соединяли с входным, а периферический – с выходным каналом перфузионного насоса. Канюли через тройники соединяли с шунтирующей трубкой в обход насоса для немедленной реперфузии задней четверти туловища крысы. Восстановление кровотока начинали сразу после затягивания лигатур вокруг канюль и удаления клипс с аорты. Перфузионный насос включали с одновременным перекрытием шунта и устанавливали объемную скорость перфузии (ОСП), при которой величина перфузионного давления (ПД) была на 5-10 мм рт. ст. выше уровня артериального давления (АД).

А.



Б.



**Рисунок 7 - Установка для выполнения эксперимента с изменяющейся скоростью перфузии**

*Примечание:* А. Вид экспериментальной установки. Б. Блок-схема экспериментальной установки: 1. Термостатируемый столик с обратной связью. 2. Роликовый насос в регулируемой скорости. 3. Система регистрации параметров гемодинамики, включающая датчики регистрации, преобразователь и персональный компьютер.

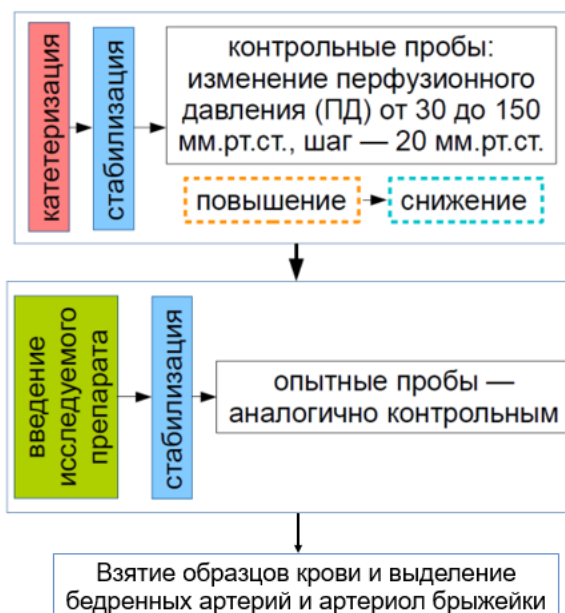
Далее производили кратковременные (0,5 – 1 мин) ступенчатые (20 мм рт. ст.) изменения ОСП таким образом, чтобы новые установившиеся уровни ПД находились в пределах 30 – 150 мм рт. ст.

Регистрацию исходных показателей гемодинамики, а также параметров микроциркуляции осуществляли после стабилизации параметров (15 минут),

в течение восходящего потока (ступени давления от 30 до 150 мм рт. ст.) и нисходящего потока (от 150 до 30 мм рт. ст.). Затем запускали ток по открытому шунту, при этом производительность насоса снижалась до минимальной. Через 10 минут осуществляли однократное внутривенное введение наночастиц магнетита (2 мг/мл, 2 мл) в течение 2 минут с последующей 20 минутной стабилизацией при открытом шунте. После чего повторяли восходящую и нисходящую ступени с регистрацией указанных выше показателей (опытные значения при повышении и понижении ПД). Измерения производили в диапазоне ОСП 1,5-18 мл/мин (ОСП мин/макс, соответственно) (рисунки 8). В конце эксперимента производили взятие крови из задней полой вены для оценки уровня оксида азота (NO) и эндотелина-1 методом ИФА с использованием стандартных коммерческих наборов и автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора ChemWell 2910 (AwarenessTechnology, США).

Выделяли бедренные и брыжеечные артерии для дальнейшего исследования вазореактивности. Регистрацию параметров гемодинамики (среднее артериальное давление, САД; частота сердечных сокращений, ЧСС) осуществляли с помощью оригинального программного обеспечения PhysExp (ООО «Кардиопротект», Россия) для Windows 8.0. Состояние микроциркуляции оценивали по среднему арифметическому показателю микроциркуляции в перфузионных единицах (M, п.е.), среднеквадратичному отклонению амплитуды колебания кровотока (флакс,  $\sigma$ , п.е.) и коэффициенту вариации (Kv, %). Оценку указанных параметров осуществляли методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью анализатора ЛАКК-02 (НПП «Лазма», Москва) в участке тыльной стороны правой задней конечности в области между фалангами 1 и 2 пальца. Оценку реактивности бедренной и брыжеечной артерий проводили с помощью четырехканального миографа (DMT A/S, Дания) по описанной выше методике проволочной миографии (раздел 2.6). Контролем при оценке прижизненных параметров (параметры гемодинамики, микроциркуляции) являлись животные,

находящиеся в условиях управляемой перфузии до введения МНЧ (исходные показатели). Контролем при оценке вазомоторных реакций и метаболической активности эндотелия (NO и эндотелин-1) являлись интактные животные.



**Рисунок 8 - Этапы эксперимента с изменяющейся скоростью кровотока**

## **2.8 - Исследование органного распределения магнитных наночастиц оксида железа**

Эксперимент выполнен на самцах крыс стока Wistar массой 250-280 грамм. Экспериментальные группы формировались случайным образом (таблица 6). Животных фиксировали поочередно в рестрейнер и осуществляли однократное внутривенное введение исследуемых образцов в латеральную хвостовую вену с соблюдением асептических условий (n=15 для каждого вида МНЧ, по 5 животных в каждой дискретной точке).

В качестве контроля для определения эндогенного (фонового) содержания железа использовались интактные животные. С учетом широкой вариативности значений содержания железа в организме крыс Wistar [13], полученные результаты по содержанию железа принимались за его



эндогенные уровни в различных органах, при этом органное распределение МНЧ оценивали с учетом его вычитания.

**Таблица 6 - Характеристика экспериментальных групп с указанием доз и вида наночастиц**

Группа животных (n)	Концентрация МНЧ, мг/мл /доза, мг/животное
МНЧ1 (n=15, по 5 животных в каждой дискретную точку)	0,7 / 1,4
МНЧ2 (n=15, по 5 животных в каждой дискретную точку)	0,7 / 1,4
ФР (n=5)	Эквивалентный объем

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; ФР – физиологический раствор.

Объем введения исследуемых препаратов не превышал максимально допустимые значения для лабораторных животных [27] и составил 2 мл (1,4 мг наночастиц).

На дискретных точках (1, 3, 6 и 24 часа после введения исследуемых агентов) осуществляли эвтаназию и немедленное изъятие органов: печени, сердца, почек, селезенки, головного мозга, легких (основных барьерных органов и предполагаемых органов-мишеней). Отбор проб осуществляли в соответствии с МУ 1.2.2745-10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных». Транспортировку и хранение биопроб осуществляли в условиях «холодовой цепи» согласно МУ 1.2.2745-10. Длительное хранение проб осуществляли в условиях «глубокого холода» при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  в морозильной камере. Полученные образцы органов лиофилизировались с помощью лиофильной сушки ZirBus VaCo 2 (Германия) при температуре  $-50^{\circ}\text{C}$ . Затем органы взвешивались и помещались в коническую плоскодонную колбу, после чего заливались 20 мл

концентрированной (70%) азотной кислоты и 20 мл  $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$  и кипятились на колбонагревателе в течение 1 часа для обеспечения его полной минерализации, после чего объем доводился до 100 мл. Полученный раствор анализировался на совместное содержание катионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  фотоколориметрическим методом в присутствии сульфосалициловой кислоты в аммиачной среде согласно ГОСТ 35514-2013, ГОСТ 26473.3-85, ГОСТ 11930.7-79. Проводили предварительную калибровку по навеске карбонильного железа, растворенного в смеси кислот (1:1 соляная:азотная). Концентрация сульфосалициловой кислоты составляла 20 % масс. Раствор аммиака добавляли, исходя из соотношения 1:1. Приготовленный из навески раствор (1000 мл) отбирали аликвотами 1 мл, 0,8 мл, 0,6 мл, 0,4 мл, 0,2 мл автоматическим дозатором в колбы по 100 мл. После этого добавляли 10 мл раствора сульфосалициловой кислоты и раствор аммиака до появления желтой окраски + избыток (всего 25 мл), после чего через 20 мин измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре SQ-2802S (UNICO, США). После этого повторяли приготовление растворов.

Для анализа использовали 0,5 мл исследуемого раствора. Для каждой пробы анализ проводили тоекратно с усреднением полученных данных. Полученные результаты нормировались на 1 грамм сухой биопробы.

## **2.9 - Исследование системных эффектов однократного и многократного внутривенного введения крысам магнитных наночастиц оксида железа**

Животных (самцы и самки крыс стока Wistar массой 250-300 грамм) случайным образом распределяли по экспериментальным группам (таблица 7).

При однократном введении суспензию МНЧ1 и МНЧ2 вводили в латеральную хвостовую вену как описано в разделе 2.4 в дозировке 400,0 мг/кг.

**Таблица 7 - Характеристика экспериментальных групп с указанием доз и видов наночастиц**

Группа животных (n)	Доза МНЧ, мг/кг	
Однократное введение МНЧ		
МНЧ1 (n=16, 8 самок+8 самцов)	400,0	
МНЧ2 (n=16, 8 самок+8 самцов)	400,0	
ФР-контроль (n=10, 5 самок+5 самцов)	2 мл физиологического раствора	
Многократное введение МНЧ		
МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 (n=24, 6 самок+6 самцов на каждую из доз)	30,0	60,0
МНЧ2-10,0 и МНЧ2- 30,0 (n=26, 6 самок+6 самцов на дозу 10,0 мг/кг и 7 самок+7 самцов на дозу 30,0 мг/кг)	10,0	30,0
ФР (n=6)	2 мл физиологического раствора	

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; ФР – физиологический раствор.

Выбранная доза была подобрана на предварительном этапе эмпирическим путем с учетом данных литературы как предельная доза наночастиц магнетита (МНЧ1), не вызывающая в течение первых суток после введения гибели 4 самцов крыс. Введение происходило в течении 5 часов с интервалом 1 час. Многократное введение исследуемых агентов в течении 24 часов при изучении их токсикологических эффектов, согласно руководству по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ, приравнивается к однократному введению.

Для определения оказываемых эффектов МНЧ при многократном внутривенном введении крысам использовали растворы исследуемых агентов в двух дозах с учетом результатов однократного введения: 30,0 мг/кг и 60,0 мг/кг для МНЧ1 и 10,0 мг/кг и 30,0 мг/кг для МНЧ2 (с учетом более

выраженного по сравнению с МНЧ1 токсического действия МНЧ2, показанного на предварительном этапе подбора доз). Объекты исследования вводили ежедневно в течение 7 дней. Длительность введения обусловлена длительностью планируемого клинического применения.

В качестве контрольных выступали группы животных, которым вводили эквивалентный объем ФР.

В ходе эксперимента оценивали:

Гибель животных: Наблюдение за выживаемостью животных осуществляли ежедневно от начала до окончания периода наблюдения.

Массу тела животных: Масса тела животных регистрировалась: перед введением, затем на 15-й день и в день некропсии (31-й день). Для оценки изменения массы тела использовали электронные весы лабораторные серии GX-600 (Япония) и компактный принтер AD-8121B с точностью 0,01 г.

Потребление корма и воды: Учет потребления воды и корма крысами осуществляли перед началом введения, на 15-е и 31-е сутки после введения наночастиц путем регистрации количества потребляемого корма и жидкости на клетку и делением полученного количества на количество дней и животных в клетке.

Компонентный состав тела: МР-релаксометрия производилась с помощью тканевого анализатора состава тела EchoMRI 500 (система Echo Medical Systems' EchoMRI™ Whole Body Composition Analyzer) в следующем режиме: жировая ткань, общее количество воды в организме (суммарно - внутриклеточная жидкость, находящаяся в организме в связанном состоянии (отеки) и внеклеточная жидкость (кровь, лимфа)) с перерасчетом в % относительно массы тела животного. Регистрацию вышеописанных параметров осуществляли перед введением, затем на 15-й день и в день некропсии (31-й день).

Клинические исследования:

Анализ мочи: Анализ проводился на 31-е сутки после введения МНЧ на экспресс-анализаторе мочи DocUReader 2 Pro (77 Elektronika, Венгрия) при

помощи тест-полосок LabStrip U11 Plus (77 Elektronika, Венгрия). Определяли следующие параметры: билирубин, уробилиноген, кетоновые тела, глюкоза, протеин, кровь, уровень pH, нитриты, лейкоциты, удельный вес мочи. С помощью микропипетки на индикаторные полоски наносили исследуемую мочу и помещали в считывающее устройство анализатора.

Гематология: Взятие крови осуществлялось перед началом введения, на 15-е и 31-е сутки после однократного или последнего (при многократном режиме) введения наночастиц методом прокола ретроорбитального сосудистого сплетения в пробирки с ЭДТА-К3 в объеме 250 мкл. Анализ проводили на ветеринарном гематологическом анализаторе Abacus junior Vet (Diatron). Определяли следующие параметры крови: содержание лейкоцитов (WBC, Г/л), фракции лейкоцитов: гранулоциты (Gr, %), лимфоциты (Lym, %), моноциты (Mi, %), количество эритроцитов (RBC,  $\times 10^{12}/л$ ), содержание гемоглобина (Hb, г/л), эритроцитарные индексы: среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, pg), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC, г/л), средний объем эритроцитов (MCV, fl), гематокрит (Hct, %), количество тромбоцитов (PLT,  $\times 10^9/л$ ).

Биохимический анализ крови: Взятие крови осуществлялось перед началом введения, на 15-е и 31-е сутки после однократного или последнего (при многократном режиме) введения наночастиц методом прокола ретроорбитального сосудистого сплетения в пробирки, содержащие активатор свертывания ( $SiO_2$ ) в объеме 1 мл. Для получения плазмы крови образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Хранение плазмы до проведения анализа осуществлялось при  $-80\text{ }^{\circ}C$ . Определение биохимических показателей осуществлялось на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 Combi (США) с использованием стандартных коммерческих наборов. Определяли следующие показатели: общий белок, глюкоза, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), билирубин (общий).

Коагулометрические исследования: Взятие крови перед началом введения, на 15-е и 31-е сутки после однократного или последнего (при многократном режиме) введения наночастиц осуществлялось методом прокола ретроорбитального сосудистого сплетения в пробирки, содержащие антикоагулянт — 3,8% раствор цитрата натрия. 1 мл крови немедленно перемешивали с антикоагулянтом с последующим центрифугированием 2000 об/мин в течение 15 минут. Анализ проводили в течении не более 2 часов после забора крови. Определяемые параметры: протромбиновое время (ПТ), концентрация фибриногена, тромбиновое время (ТТ), активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ). Показатели свертываемости крови проводились на коагулометре HumaClot Duo Plus с использованием реагентов Hemostat (Human GmbH). Для определения протромбинового времени плазма крови помещалась в кювету прибора, далее добавляли подогретый тромбoplastин. Время образования сгустка автоматически фиксировал фотометр прибора. Для определения фибриногена по Клауссу все пробы пациентов и контрольные материалы разводили 1:10 имидазоловым буфером. После добавления тромбинового реагента прибор автоматически фиксировал время образования сгустка, который формируется вследствие полимеризации фибрина. Для определения тромбинового времени плазму крови помещали в кювету, после 3 минут инкубации добавляли тромбиновый реагент. Прибор автоматически фиксировал время образования сгустка. Для определения АЧТВ к плазме, помещенную в кювету прибора, добавляли раствор активатора и фосфолипидов, после чего в кювету добавляли подогретый  $\text{CaCl}_2$ . Прибор автоматически фиксировал время образования сгустка.

Иммуноферментный анализ: Взятие крови осуществлялось перед началом введения, на 15-е и 31-е сутки после однократного или последнего (при многократном режиме) введения исследуемых агентов методом прокола ретроорбитального сосудистого сплетения в пробирки, содержащие Li-гепарин. Далее их центрифугировали при 3000 об/мин — 10 минут при 4 °С,

хранение осуществлялось при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Изменение содержания моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) и цитокина интерлейкин- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), играющих роль посредников в развитии воспаления, определялось методом ИФА на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 Combi (AwarenessTechnology, США) с использованием стандартных коммерческих наборов.

Патоморфология и гистология: Некropsию осуществляли на 31-й день после первого введения МНЧ. При некрпсии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями, каркас и скелетно-мышечную систему. При плановой эвтаназии были взвешены следующие органы: печень; почка (правая и левая); сердце; головной мозг; селезенка, легкие. Кроме абсолютного веса органов, определяли процентное отношение веса органа к весу тела (массовый коэффициент). Взвешивание органов проводили на лабораторных весах с точностью 0,01 г. Парные органы взвешивали вместе, перед взвешиванием органы очищали от соединительной ткани. Некрпсийный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH 7,4) в течение суток, обезвоживали в изопропиловом спирте возрастающей концентрации и заливали в парафиновые блоки по стандартной методике. Срезы готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония).

Общее гистологическое описание проводилось на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (ООО «Биовитрум»). Для обнаружения ионов  $\text{Fe}^{3+}$  использовали гистохимический способ Перлса. Микрофотографии получали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U. Морфометрических анализ осуществляли с помощью программы NIS-Elements Version 4.3. Изучали морфологию следующих органов: печень, селезенка, почки, легкие. Подсчет Перлс-положительных клеток проводили с перерасчетом на  $1\text{ мм}^2$  гистологического препарата.

Анализ данных, полученных от самцов и самок крыс, проводили отдельно.

### **2.10 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях *in vivo* при наличии внешнего магнитного поля**

Эксперимент проводили с использованием самцов крыс стока Wistar массой 250-275 грамм. Все воздействия осуществляли на наркотизированных животных под контролем выраженности «роговичного рефлекса», а также рефлекса на болевой раздражитель – щипок кожи на конечности животного. Крыс размещали на нагревательной платформе TCAT-2LV (PHYSITEMP Instruments Inc., США) для поддержания температуры тела на постоянном физиологическом уровне. Осуществляли разрез кожи по средней линии в области шеи для интубирования трахеи, после чего осуществляли подключение к аппарату искусственной вентиляции легких (SAR-830P, Stoelting, США). Затем в общую сонную артерию и бедренную вену вводили канюли с целью мониторинга артериального давления (АД) и поддержания достаточной глубины анестезии, соответственно. В бедренную вену вводили канюлю для введения исследуемых агентов. Для обеспечения доступа к органам осуществляли торакотомию и лапаротомию.

С помощью оригинального программного обеспечения PhysExp (ООО «Кардиопротект», Россия) регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС), среднее артериальное давление (САД).

Для оценки микроциркуляции с помощью поверхностного датчика (диаметр 10 мм) лазерного доплеровского флоуметра (ЛДФ) BSL 21 (Transonic Systems Inc., США) производили регистрацию уровня перфузии в каждом из органов тройкратно с дальнейшим усреднением показателей (сердце, печень, селезенка и почки). Определяли: уровень микроциркуляторной перфузии (М, п.е.); среднее квадратичное отклонение



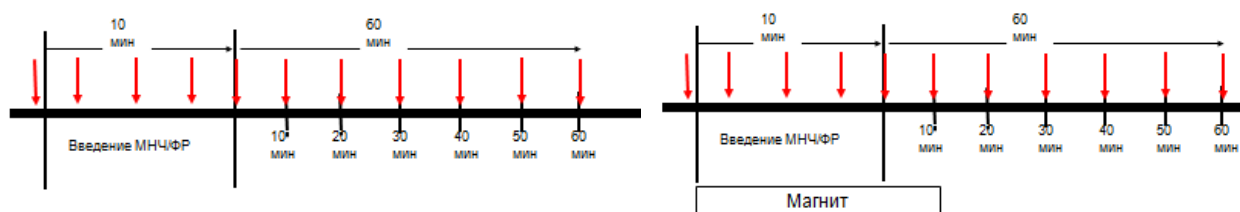
амплитуды колебаний кровотока от среднего арифметического значения ( $\sigma$ , п.е.) [22].

Указанные параметры регистрировали исходно, в процессе 10-минутного введения МНЧ и в течение часа с интервалом в 10 минут после введения МНЧ. В сериях экспериментов с применением магнитного поля обеспечивали размещение магнита в области сердца животного с момента начала введения МНЧ и в течение 10 минут после окончания их введения (рисунки 9).

Однократное внутривенное введение исследуемых агентов в бедренную вену крыс осуществляли в течение 10 минут с одновременным мониторингом вышеуказанных показателей.

А.

Б.



**Рисунок 9 - Экспериментальный протокол**

*Примечание:* А. — в условиях пассивного транспорта МНЧ; Б. — в условиях воздействия внешнего магнитного поля. ↓ — временные точки регистрации гемодинамических параметров.

Экспериментальные группы формировали случайным образом, (таблица 8).

**Таблица 8 - Характеристика экспериментальных групп с указанием доз и вида наночастиц и наличия/отсутствия магнитного поля**

Группа/количество животных	Исследуемый агент/доза, мг/животное	Наличие/отсутствие внешнего магнитного поля
МНЧ1 (n=9)	Наночастицы магнетита/1,4	-
МНЧ2 (n=9)	Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния/1,4	-
Контроль (n=9)	ФР, эквивалентный объем	-
МНЧ1 + магнит (n=9)	Наночастицы магнетита/ 1,4	+
МНЧ2 + магнит (n=9)	Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния/ 1,4	+
Контроль + магнит (n=9)	ФР/ эквивалентный объем	+

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; ФР – физиологический раствор.

Объем введения исследуемых веществ не превышал максимально допустимые значения для данного вида животных [27] и составил 2 мл (1,4 мг наночастиц). При проведении эксперимента под управлением внешнего магнитного поля с известными характеристиками (*таблица 9*), воздействие магнитом осуществляли в области сердца (*рисунок 10*).



**Рисунок 10 - Расположение магнита при проведении эксперимента с введением наночастиц в условиях воздействия внешним магнитным полем**

**Таблица 9 - Характеристики неодимовых магнитов, используемых в эксперименте**

Характеристики/ класс	N35
Остаточная магнитная индукция, мТл (кГс)	1170-1220 (11,7-12,2)
Козрцитивная сила, кА/м (кЭ)	$\geq 955$ ( $\geq 12$ )
Магнитная энергия, кДж/м <sup>3</sup> (МГсЭ)	263-287 (33-36)

Критериями исключения животных из эксперимента являлись:

1. Погрешности при осуществлении хирургических процедур, обусловившие кровотечения.
2. Устойчивое падение систолического артериального давления (САД) менее 80 мм рт.ст. на этапе до введения исследуемых агентов.

### **2.11 - Исследование влияния магнитных наночастиц оксида железа на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях *ex vivo* при наличии внешнего магнитного поля**

Исследование выполнено на изолированных сердцах самцов крыс стока Wistar массой 280-320 грамм с помощью экспериментальной установки. (рисунки 11).

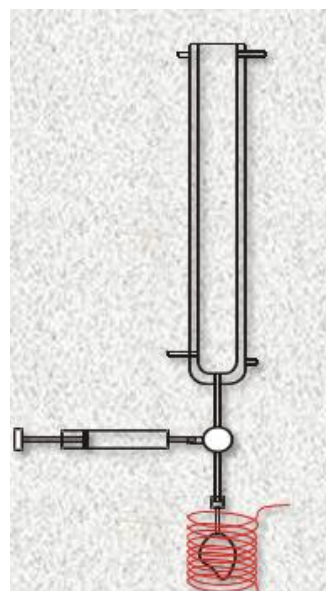
А.



Б.



В.

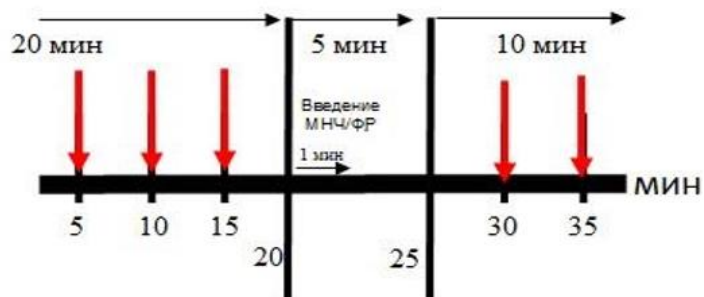


**Рисунок 11 - Экспериментальная установка для перфузии изолированного сердца**

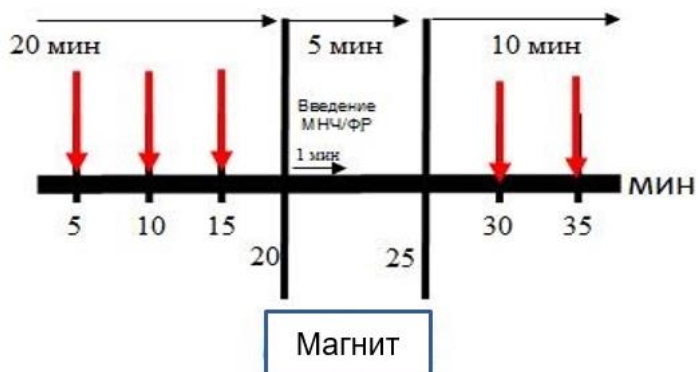
*Примечание:* А, Б. Вид установки. В. Схема установки.

Наркотизированным внутривенным введением 200-250 мг/кг хлоралгидрата крысам вскрывали грудную клетку и извлекали сердца. Непосредственно после извлечения сердца помещали в охлажденный (4°C) раствор Кребса-Хензеляйта (К-Х) следующего состава: (мм:  $\text{Na}^+$  – 143,0;  $\text{K}^+$  – 5,9;  $\text{Ca}^{2+}$  – 1,2;  $\text{Mg}^{2+}$  – 1,2;  $\text{Cl}^-$  – 125,1;  $\text{HCO}_3^-$  – 25,0;  $\text{SO}_4^{2-}$  – 1,2;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  – 1,2; Глюкоза – 11,0). Выделенные сердца закрепляли на канюле установки для перфузии изолированного сердца.

Изолированные сердца перфузировали оксигенированным (95% - кислород, 5% - углекислый газ) раствором К-Х при постоянной температуре раствора 37 °С, рН  $\approx$  7,4 по схеме: 20 мин перфузии (адаптация) + введение МНЧ/ФР в течение одной минуты (интракоронарно) + 15 мин перфузии (рисунки 12). Исследование проводили в двух режимах: в условиях воздействия внешнего магнитного поля и в условиях его отсутствия.



А.



Б.

### Рисунок 12 - Экспериментальный протокол

*Примечание:* А. Режим отсутствия внешнего магнитного поля. Б. Режим воздействия внешнего магнитного поля. ↓ – временные точки регистрации гемодинамических параметров.

Воздействие магнитным полем осуществляли с момента начала введения и 4 минуты после окончания введения МНЧ/ФР. Введение исследуемых агентов производилось на этапе окончания адаптации в течение 1 минуты со скоростью 1 мл/мин. Объем введения составил 1 мл (0,7 мг наночастиц). Группы формировались случайным образом (таблица 10).

**Таблица 10 - Характеристика экспериментальных групп с указанием доз и видов наночастиц**

Группа/количество животных	Исследуемый агент/доза, мг/мл	Наличие/отсутствие внешнего магнитного поля
К-БМ (n=8)	ФР/эквивалентный объем	-
К-М (n=8)	ФР/эквивалентный объем	+
МНЧ1-БМ (n=8)	Наночастицы магнетита/ 0,7	-
МНЧ1-М (n=8)	Наночастицы магнетита/ 0,7	+
МНЧ2-БМ (n=8)	Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния/ 0,7	-
МНЧ2-М (n=8)	Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния/ 0,7	+

*Примечание:* К-БМ – группа контроля без использования магнита; К-М – группа контроля с использованием магнита; МНЧ1-БМ – группа с введением наночастиц магнетита без использования магнита; МНЧ1-М – группа с введением наночастиц магнетита с использованием магнита; МНЧ2-БМ – группа с введением композитных наночастиц без использования магнита; МНЧ2-М – группа с введением композитных наночастиц с оболочкой из полилактида с использованием магнита.

Источником внешнего магнитного поля служил соленоид с характеристиками: длина соленоида/L=0,02 м; радиус/R=0,018 м; сила тока/I=0,469 А; число витков в катушке/N=500. Расчёт величины проекции вектора магнитной индукции на осевую прямую, проходящую перпендикулярно через центр катушки соленоида, осуществляли в программе MATLAB-2017 [11].

Для проведения экспериментов на изолированном сердце в условиях воздействия внешнего магнитного поля центр катушки соленоида располагался на расстоянии 2,5 см от изолированного сердца.

Оценивали сократительную функцию сердца в изоволюмическом режиме по показателям: систолическое давление (СД, мм рт. ст.), конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.), давление, развиваемое левым

желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.) (вычисляли как разницу между систолическим и диастолическим давлениями), частота сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин). Регистрация сократительной функции миокарда производилась при помощи латексного баллончика, введенного в полость левого желудочка и соединенного с аппаратом PhysExp (Россия) на этапах адаптации, окончания введения исследуемых агентов и на момент окончания эксперимента. Также оценивали коронарный проток (КП) – количество перфузата, протекающего через коронарные сосуды изолированного сердца в единицу времени (мл/мин). Регистрация КП производилась на момент окончания адаптации и на этапе окончания эксперимента. За критический уровень снижения параметров функционирования миокарда принимали: коронарный проток менее 6 мл/мин, ДРЛЖ менее 70 мм рт.ст.

Критерии исключения изолированных сердец из исследования:

1. Технические ошибки (неправильная катетеризация изолированного сердца или введение баллончика).
2. Коронарный проток менее 7 и более 15 мл/мин (на момент окончания адаптации).
3. Нарушения ритма сердечного сокращения (на этапе адаптации).
4. ДРЛЖ менее 80 мм рт.ст (на момент окончания адаптации).
5. Отрицательная динамика показателей в течение 20-минутного стабилизационного периода (ДРЛЖ, КДД, ЧСС, интенсивность КП).

После окончания эксперимента сердца подвергались заморозке при  $-80^{\circ}\text{C}$  с последующей лиофилизацией при  $-50^{\circ}\text{C}$  в лиофильной сушке (VaCo 2ZiRBUS technology, MITSUBISHI GOT1000, Германия) и минерализацией для оценки накопления магнитных наночастиц в миокарде аналитическим методом.

Определение массовой концентрации общего железа осуществляли фотометрическим методом с помощью спектрофотометра 2802S UV/vis UNICO (UNICO SYS, США). Метод основан на образовании

сульфосалициловой кислотой или ее натриевой солью с солями железа окрашенных комплексных соединений. При этом в слабокислой среде сульфосалициловая кислота реагирует только с солями железа ( $3^+$ ) с появлением красного окрашивания, а в слабощелочной среде - с солями железа ( $2^+$ ) и ( $3^+$ ) с появлением желтого окрашивания. Светопоглощение окрашенных комплексов железа определяли при длине волны  $\lambda = 425-430$  нм. Предварительную калибровку проводили по методу, подробно написанному в разделе 2.8.

Сердца взвешивали на аналитических весах (Ohaus DV114C). Минерализация сердец проводилась в смеси равных частей концентрированной азотной кислоты и дистиллированной воды (всего 50 мл) в колбонагревателе при температуре кипения в течении 1-1,5 часов. Далее раствор охлаждали, объем доводили до 100 мл и отбирали пробу 2 мл и по методу, описанному выше, определяли общее содержание железа. Определение проводили в трехкратном повторе. Полученные результаты представляли в мг/г сухой массы органа.

## **2.12 - Исследование морфофункционального состояния сосудов в условиях однократного внутривенного введения крысам модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа**

Исследование выполнено на самцах крыс стока Wistar массой 240-260 г. Животным осуществляли однократное внутривенное введение исследуемых образцов в латеральную хвостовую вену как подробно описано в разделе 2.4. Группы формировались случайным образом в соответствии с используемыми агентами исследования (*таблица 11*). Контролем служила группа животных с введением эквивалентного объема физиологического раствора (ФР).



Через 1 час после введения исследуемых агентов производили забор крови у наркотизированных изофлюраном животных посредством прокола задней полой вены для проведения иммуно-ферментного анализа (ИФА), а также выделение брыжейки тонкого кишечника для проведения миографии и образцов сосудов брыжейки для гистологических исследований.

**Таблица 11 - Характеристика экспериментальных групп с указанием используемых доз и видов наночастиц**

Группа животных (n)	Концентрация МНЧ, мг/мл /доза, мг/животное
МНЧ+полилактид (n=9)	0,7/1,4
МНЧ+полисахарид (n=9)	0,7/1,4
МНЧ+альбумин (n=9)	0,7/1,4
ФР (n=5)	Эквивалентный объем

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита, модифицированные оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита, модифицированные оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин - наночастицы магнетита, модифицированные оболочкой из альбумина.

Исследование функциональной активности эндотелия проводили на проволочном миографе (DMT 620M, Дания) согласно методике, подробно описанной в п. 2.6.

Исследование плазмы крыс с определением уровня оксида азота проводили на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 Combi (AwarenessTechnology, США) с использованием стандартных коммерческих наборов.

Для проведения гистологического анализа сосудов их предварительно фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 1 суток, после чего по общепринятой методике заливали в парафин. Затем изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Также образцы окрашивали по Перлсу для определения трехвалентного

железа. Морфологический анализ проводили с помощью светооптического микроскопа Carl Zeiss Primo Star (Германия) при увеличении 100 и 400. Микрофотографирование осуществляли при помощи цифровой фотокамеры Tour Cam (TourCam, Китай) и программного обеспечения Tour View.

### **2.13 - Исследование патофизиологических эффектов модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа при их однократном внутривенном введении крысам**

Исследование проведено на самцах крыс стока SpragueDawley массой 270-290 грамм. Животных распределяли по экспериментальным группам случайным образом (*таблица 12*).

Осуществляли однократное внутривенное введение исследуемых агентов животным в дозах 200,0, 100,0, 50,0 и 25,0 мг/кг как описано в разделе 2.4.

После введения исследуемых агентов за животными наблюдали непрерывно в день введения, затем регулярно (на 3-й и 6-й день). Срок наблюдения составил 9 дней. Кровь на гематологические исследования забирали непосредственно перед эвтаназией. При вскрытии животных проводилась макроскопическая оценка патоморфологических изменений, определялась масса органов, а также производился сбор коллекции органов для последующего гистологического анализа при появлении в нем необходимости.

Выявление смертности, тяжелого состояния, общего состояния здоровья проводилось: в будние дни дважды в день (в первой и во второй половине дня), в выходные дни – 1 раз в день.

Клинический осмотр проводили с соответствующими отметками в индивидуальных картах животных.

Кровь у животных забирали из задней полой вены. Кровь забирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДКТК<sub>3</sub>) в объеме 250 мкл. Исследование

проводили с помощью автоматического гематологического анализатора URIT – 3000 (URIT Medical Electronic Group Co., Ltd; КНР). Анализировали следующие показатели: общее количество и относительное содержание лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, гранулоцитов, общее количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, тромбоциты, средний объем тромбоцитов.

**Таблица 12 - Характеристика экспериментальных групп с указанием доз и вида наночастиц**

Группа/ Вводимое вещество	Доза, мг/кг	Количество животных (n)
МНЧ+полилактид	200,0	10
МНЧ+полилактид	100,0	10
МНЧ+полилактид	50,0	5
МНЧ+полилактид	25,0	5
МНЧ+полисахарид	200,0	5
МНЧ+полисахарид	100,0	5
МНЧ+полисахарид	50,0	5
МНЧ+полисахарид	25,0	5
МНЧ+альбумин	200,0	5
МНЧ+альбумин	100,0	5
МНЧ+альбумин	50,0	5
МНЧ+альбумин	25,0	5

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита, модифицированные оболочкой из полилактоида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита, модифицированные оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин - наночастицы магнетита, модифицированные оболочкой из альбумина.

При некропии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую

полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями, каркас и скелетно-мышечную систему. Все отклонения от нормы документировали в акте вскрытия.

При плановой эвтаназии были взвешены следующие органы: головной мозг, сердце, печень, селезенка, почки, легкие, тимус, надпочечники, яички. Кроме абсолютного веса органов, определено процентное отношение веса органа к весу тела. Коллекция включала в себя: головной мозг (лобные доли больших полушарий, мозжечок, продолговатый мозг, мост), печень, почки, надпочечники, селезенка, сердце, трахея, легкие, яички. У всех вскрытых животных после взвешивания органы (или их части) были зафиксированы в нейтральном 10 % растворе формалина. Фиксированные в формалине ткани обезвоживали в растворе для гистологической обработки (обезвоживание и просветление) на основе абсолютизированного изопропилового спирта IsoPrep («БиоВитрум», С.-Петербург), заливали в гомогенизированную парафиновую среду для заливки Bio Plast Extra («BioOptica», Италия); из парафиновых блоков делали срезы толщиной 5–7 мкм при помощи ротационного механического микротомы НМ 325 (Германия). Срезы окрашивали стандартно - гематоксилином и эозином (красители фирмы BioOptica, Италия). Окрашенные препараты заключали в синтетическую монтирующую среду Bio Mount («BioOptica», Италия). Срезы исследовали световой микроскопией на микроскопе Axio Lab.A1 («Carl Zeiss», Германия).

#### **2.14 - Исследование влияния наночастиц оксида железа с различным качественным составом оболочек на генерацию активных форм кислорода в динамике инкубации с кровью человека**

Оценку генерации активных форм кислорода (АФК) осуществляли в условиях без индукции выработки АФК (спонтанная хемилюминесценция, ХЛ) и в условиях индукции генерации АФК (индуцированная ХЛ и индуцированный окислительный гемолиз). Объем выборки во всех

экспериментальных группах составил 8 образцов. Для выявления дозозависимости оказываемых эффектов, исследовали МНЧ в концентрациях 0,2; 1,0 и 2,0 мг/мл. Регистрацию всех изучаемых параметров в каждом образце осуществляли в трехкратных повторах. Уровень АФК детектировали с помощью метода люминолзависимой клеточной ХЛ на хемилюминометре Lum-1200 (ДИСофт, Россия) при 37°C. Исследование параметров спонтанной и индуцированной ХЛ, а также оценку выраженности индуцированного окислительного гемолиза эритроцитов проводили в условиях *in vitro* с использованием донорской гепаринизированной цельной крови человека (некурящие мужчины, возраст 20-45 лет).

К 100 мкл крови при постоянном перемешивании добавляли 100 мкл раствора МНЧ в концентрациях 0,2; 1,0 и 2,0 мг/мл. Полученную взвесь инкубировали при постоянном перемешивании на возвратно-поступательном шейкере (Heidolp, Германия) при 200 об/мин. Контролем служили образцы крови с добавлением эквивалентного объема физиологического раствора (ФР). Регистрацию исследуемых показателей осуществляли через 3 часа инкубации при постоянном перемешивании (200 об/мин). С целью измерения ХЛ каждого образца к 100 мкл инкубационной взвеси добавляли 700 мкл раствора Хэнкса и 100 мкл раствора люминола и измеряли показатель спонтанной ХЛ в течение 10 минут, после чего в каждую кювету было добавлено 100 мкл опсонизированного зимозана. После этого регистрировали показатели индуцированной ХЛ в течение 30 мин.

Оценивались следующие показатели: интегральные значения интенсивности ХЛ (S) для оценки спонтанной и индуцированной ХЛ, соответственно, характеризующие суммарный уровень АФК за 10 мин исследования (спонтанная ХЛ) и 30 мин. исследования (индуцированная ХЛ); для индуцированной ХЛ – дополнительно: время достижения максимальной интенсивности ХЛ ( $X_{max}$ ), характеризующее скорость развития ХЛ-реакции; максимальная интенсивность свечения ( $I_{max}$ ), отражающая максимальный

уровень АФК. Из регистрируемых значений ХЛ вычитали фоновое свечение хемиллюминометра.

Для оценки индуцированного окислительного гемолиза эритроцитов производили выделение последних с помощью центрифугирования (10 мин, 2800 об/мин) и троекратной промывки в ФР. Затем получали конечную взвесь посредством разбавления полученной эритроцитарной взвеси забуференным ФР (0,15 М натрия хлорида и 0,01 М натрий-фосфатного буферного раствора, рН 7,4), к которой добавляли 250 мМ гипохлорита натрия (ГХН). В опытных группах непосредственно после этого осуществляли добавление в инкубационную взвесь МНЧ (1:1 по отношению к объему эритроцитарной взвеси). Производили измерение оптической плотности полученных образцов ( $\lambda = 540$  нм) на спектрофотометре UNICO-2802S (UNICO SYS, США) через 5 мин (исходный уровень), через 60 и 180 мин после добавления ГХН при постоянном перемешивании на возвратно-поступательном шейкере (Heidolph, Германия) (200 об/мин) и комнатной температуре.

За положительный контроль принимали образцы со 100% гемолизом, индуцированным добавлением 0,01% раствора додецилсульфата натрия. За негативный - образцы с добавлением ФР.

Коэффициент гемолиза (КГ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КГ, \%} = (\text{ОП}_{\text{оп}} - \text{ОП}_{\text{нк}}) / (\text{ОП}_{\text{пк}} - \text{ОП}_{\text{нк}}) * 100\%, \text{ где} \quad (2)$$

ОП — оптическая плотность;

нк – отрицательный контроль;

пк - положительный контроль;

оп – опытный образец.

За контрольные принимались значения, полученные посредством добавления к взвеси эритроцитов ГХН при отсутствии наночастиц.

## 2.15 - Экспериментальное обоснование возможности использования магнитных наночастиц оксида железа для их магнитоуправляемой доставки в ткань (стендовые условия, *ex vivo*)

В исследовании использовали постоянные магниты Nd-Fe-B класса N35 (защитное покрытие – никель) цилиндрической формы типоразмеров (длина вдоль оси – диаметр цилиндрика): 0,5×2 мм, 2×2 мм, 3×2 мм, 5×2 мм, а также стандартные образцы хирургических стентов из нитинола двух видов: из толстой и тонкой проволоки.

Определение оптимальных геометрических характеристик постоянных магнитов цилиндрической формы и магнитных характеристик модельных хирургических стентов осуществляли расчетными способами с помощью численных расчетов и программы MatLab (2017).

Исследования в стендовых условиях и условиях *ex vivo* проводились на гидродинамическом стенде, разработанном в Институте экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» Минздрава России (рисунк 13).

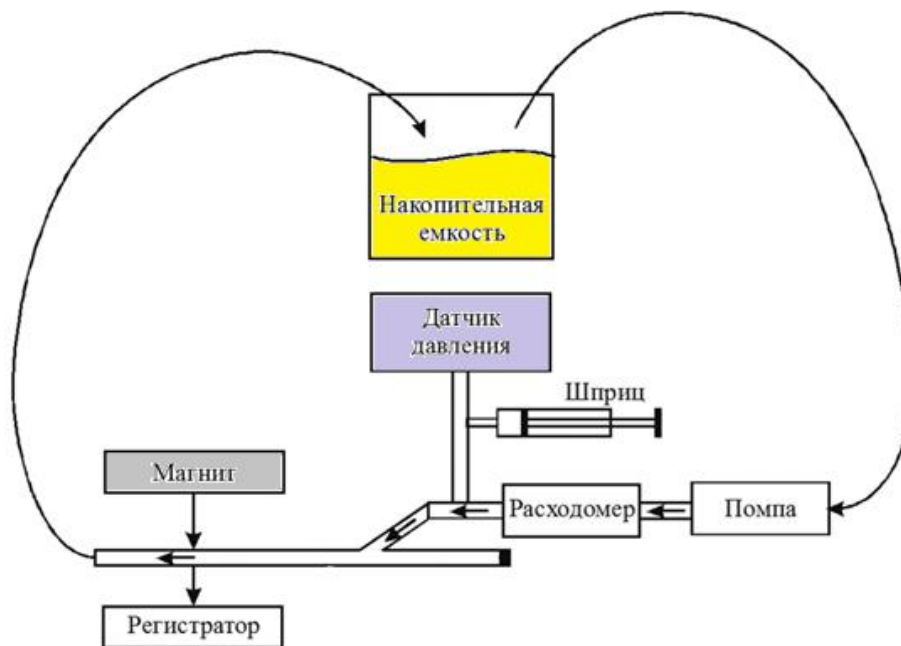
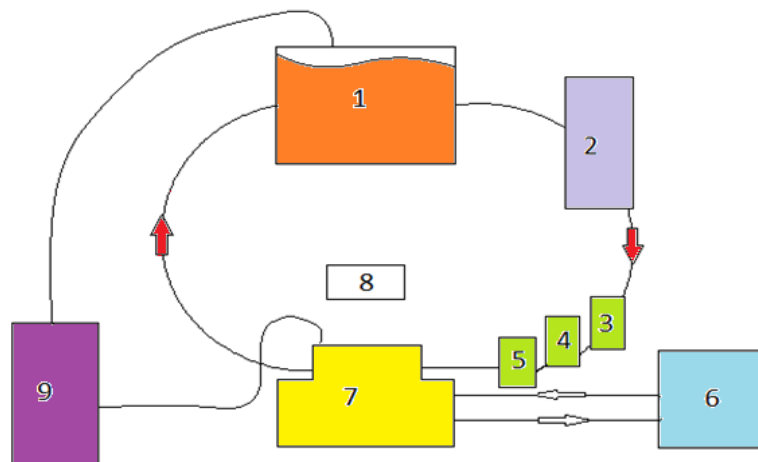


Рисунок 13 - Экспериментальный гидродинамический стенд

Объём циркулирующей жидкости ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$  или раствор К-Х, являющийся аналогом плазмы крови) составил 225 мл. В качестве постоянных магнитов использовались цилиндрические магниты, намагниченные аксиально. Расположение магнитов на стенде осуществляли на расстоянии 1,5 мм от внутренней стенки центральной стеклянной трубки, торцом по направлению трубки (перпендикулярно). Скорость потока жидкости внутри замкнутого контура составляла 60 л/час, что соответствует линейной скорости 0,225 м/см/сек.

Количество наночастиц, адсорбированных в магнитном поле, определяли спектрофотометрически по концентрации железа в циркулирующей жидкости после эксперимента с помощью UV-Vis спектрофотометра Unico 2802S (United Products & Instruments, США).

Также были проведены экспериментальные исследования на модифицированном гидродинамическом стенде, с помощью которого можно определить относительную проницаемость кровеносных сосудов (*рисунок 14*).



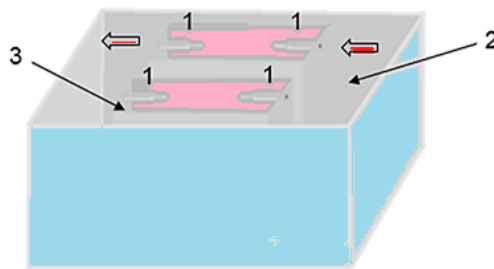
**Рисунок 14 - Установка для исследований проницаемости стенок сонной артерии крысы**

*Примечание:* 1- накопительная ёмкость, 2 - перистальтический насос, 3 - механизм введения в контур суспензии МНЧ, 4 - расходомер, 5 - датчик давления в контуре, 6 - теплообменник, 7 - камера с сосудами, 8 - источник магнитного поля, 9 – газовый баллон.



Основным элементом гидродинамического стенда является замкнутый контур, имитирующий участок сосудистой системы модели, неотъемлемым элементом которого является накопительная емкость. Движение модельной жидкости по контуру с сосудистым модулем обеспечивается за счет работы перистальтического насоса. В ходе экспериментов поддерживали газификацию и необходимый температурный режим, а также контролировали такие параметры системы как температура, давление, расход жидкости, уровень рН.

Камера с сосудами, состоящая из трех емкостей: одного внешнего большого и двух внутренних емкостей, через которые проходят рукава центрального контура, представлена на рисунке 15.



**Рисунок 15 - Камера, в которую помещаются сосуды**

*Примечание:* 1- канюли для нанизывания сосудов, 2 – внешняя камера, 3 – внутренняя камера. Стрелками показано направление движения модельной жидкости.

Канюли помещались внутрь небольших контейнеров, на которые нанизывались сосуды, плотно привязанные нитями к носицам канюль. Пространство между большой емкостью и внутренними камерами заполнялось  $H_2O_{\text{дист}}$ , температура которой поддерживалась постоянной за счет связи с теплообменниками. Пространство внутренних камер заполняли раствором Кребса-Хензеляйта (К-Х) для поддержания жизнедеятельности клеток сосуда. В накопительной ёмкости (рисунки 14) также находился раствор К-Х. С помощью системы подачи газа обеспечивалась газификация

жидкости карбогеном в накопительной ёмкости и в маленьких ёмкостях в камере с сосудами.

Для определения показателя относительной проницаемости стенок сосуда использовались сонные артерии самцов крыс стока Wistar. Суспензию МНЧ (0,5 мл, 2 мг/мл) вводили в систему со следующими характеристиками: суммарный внутренний объем накопительной емкости и соединительных трубок в контуре составлял 20 мл, а внутренний объем в каждой небольшой камере составлял 120 мл. В качестве источника внешнего магнитного поля использовали постоянный магнит стандартного размера 2×3 мм, установленный над одной из внутренних камер на расстоянии 1 см от участка с сосудом, торцом к стенке сосуда. Температурный режим составлял 37°C. Мощность роликового насоса была выставлена на 50%, что соответствовало скорости 17 см/сек. Для контрольного измерения осуществляли взятие пробы во внутренней камере, в которой отсутствовал постоянный магнит. Спустя 1 час после введения МНЧ отбирались жидкости из внутренних камер. Концентрацию наночастиц определяли спектрофотометрически при помощи UV-Vis спектрофотометра Unico 2802S (United Products & Instruments, США). С учётом спектров поглощения суспензии МНЧ измерения проводились при  $\lambda = 450$  нм. Критерием эффективности в экспериментах на гидродинамическом стенде с сосудистым модулем служило относительное содержание магнитных наночастиц, прошедших через стенку сосуда под действием источника внешнего магнитного поля при данной скорости потока за определённый промежуток времени (1 час),  $n = 6$ .

## **2.16 - Экспериментальное подтверждение возможности использования магнитных наночастиц оксида железа для их магнитоуправляемой доставки в опухолевую ткань (in vivo)**

Исследование проводили на наркотизированных изофлюраном самцах иммунодефицитных (для исключения участия иммунных процессов) мышей

NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/Szj, Лаборатория Джексона, США) массой 19-24 грамма. Животные случайным образом распределялись по группам.

Для создания модели ксенотрансплантата была выбрана линия раковых клеток человека линии HeLa. Клетки культивировали в питательной среде DMEM с глутамином (PanEco, Россия), дополненным 10% фетальной бычьей сывороткой (Hyclone, США), 100 КОЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клеточная линия была предоставлена Лабораторией регуляции экспрессии генов Института цитологии Российской академии наук. Перед инъекцией HeLa удаляли из культурального пластика раствором трипсина: версена 1:1 (Биолот, Россия), отмывали от раствора трипсина: версена, доводили полной культуральной средой до концентрации 5 млн в 200 мкл и разводили на льду 1:1 с матрицей базальной мембраны БЕЗ LDEV, MATRIGEL® CORNING®.

Мышам осуществляли введение 5 миллионов клеток в 200 мкл (50% среда + 50% Матригель) подкожно под кожу бедра. Рост опухоли контролировали каждые три дня с помощью электронного штангенциркуля. При достижении размера опухоли 500 мм<sup>3</sup> осуществляли имплантацию постоянного магнита с известными характеристиками в мышечную ткань крыс в непосредственной близости от опухоли.

Флуоресцентную визуализацию МНЧ *in vivo* проводили на биоимиджере IVIS Lumina LT Series III (PerkinElmer Inc., США) (рисунки 16 А,Б). Оптимальные фильтры для определения интенсивности свечения образцов были подобраны с учетом флуоресцентных свойств красителя – индоцианина зеленого (ИЦЗ). Для ИЦЗ максимальный пик возбуждения спектра находится на  $\lambda = 745$  нм, а излучения – 815 нм.

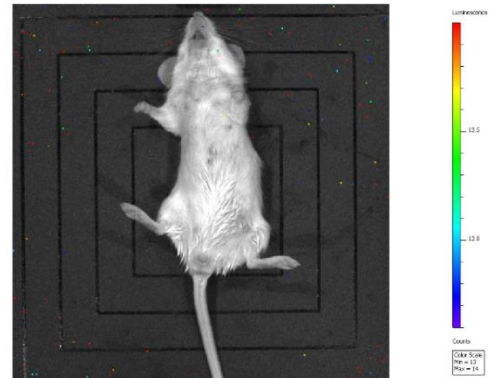
В опытной группе (ИЦЗ-МНЧ+опухоль-М) осуществляли однократное внутривенное введение 0,1 мл МНЧ в концентрации 0,7 мг/мл в условиях воздействия магнитного поля. Контролем (фон) служили интактные животные, в качестве сравнения использовались мыши с опухолевым

процессом без имплантации магнита с внутривенным введением 0,1 мл МНЧ (ИЦЗ-МНЧ+опухоль-БМ). Обнаружение сигнала проводили через 1 минуту после введения МНЧ и через 15 минут на встроенных фильтрах для флуоресцентного красителя ИЦЗ в диапазоне  $\lambda$  745-815 нм.

А.



Б.



В.



**Рисунок 16 – Проведение флуоресцентной визуализации наночастиц**  
*Примечание:* А. Установка для определения интенсивности свечения - биоимиджер IVIS Lumina LT Series III (PerkinElmer Inc., USA). Б. Положение тела животного при выполнении флуоресцентной визуализации. В. Размещение животных в камере прибора.

Анализ сигналов из выбранных областей осуществляли вручную с помощью программного обеспечения Living Image 4.5.5 (PerkinElmer Inc., США). Измерения проводили троекратно для каждого животного (n = 9).

## 2.17 - Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistica 10.0. Проверку гипотезы о равенстве средневывборочных величин в нескольких зависимых выборках проводили методами дисперсионного анализа для повторных измерений, в независимых выборках — с использованием критерия Манна—Уитни. Результаты в таблицах представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего – Mean  $\pm$  SEM и как медиана, 25-й и 75-й процентиля (Me [25%; 75%]). Различия между группами считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Первичную обработку результатов миографии проводили с использованием программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 7 для Windows. Рассчитывали концентрацию, обеспечивающую 50% максимального ответа (EC50, мкМ) и величину ответа при максимальной концентрации агониста (E<sub>max</sub>, %). Данные подвергали нелинейному регрессионному и дисперсионному анализу. Для выявления различий в значениях EC50 использовали t-тест Стьюдента. За критический уровень статистической значимости принимали  $p < 0,05$ . Расчет полумлетальных доз LD<sub>50</sub> осуществляли пробит-анализом методом Литчфилда и Уилкоксона.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ГЛАВЫ 2

*Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science*

1. Зелинская, И.А. Проволочная миография в современных научных исследованиях: методические аспекты / И.А. Зелинская, Я.Г. Торопова // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018. Т. 17, № 1 (65). С. 83-89 (ИФ РИНЦ – 0.576).

2. Торопова, Я.Г. Перфузия изолированного сердца методами

Лангендорфа и Нилли: особенности техники и применение в современных исследованиях / Я.Г. Торопова, Н.Ю. Осяев, Р.А. Мухамадияров // Трансляционная медицина. 2014. № 4. С. 34-39 (ИФ РИНЦ-0.231).

*Патент:*

3. Гидродинамический стенд для исследования проницаемости стенок сосудов для магнитных наночастиц под воздействием внешнего магнитного поля / В.И. Мишанин, М.С. Истомина, Д.В. Королёв, О.В. Корнюшин, Я.Г. Торопова // Патент на изобретение RU 2694509 C1, 15.07.2019. Заявка № 2018132156 от 07.09.2018.

### **ГЛАВА 3 – ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НЕМОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА**

С учетом того, что различные методы синтеза магнитных наночастиц определяют не только формирование таких их физических свойств, как форма, размер, агрегативная устойчивость, но и степень их химической устойчивости и очистки, которые в совокупности оказывают значительное влияние на биосовместимость полученных наночастиц, для определения возможности дальнейшего применения наноматериалов в медицинской практике, необходимо детально и всесторонне исследовать и сопоставить их свойства как с материаловедческой, так и с биомедицинской стороны.

В настоящее время в исследованиях, посвященных исследованию биосовместимости широко используются методы, альтернативные классическим тестам на экспериментальных животных – модели с использованием культур клеток (исследования *in vitro*), применение которых позволяет установить характер биологической активности изучаемых наночастиц непосредственно на клеточном уровне. Использование клеточных культур позволяет выяснить механизмы взаимодействия наноматериалов с клетками организма, а также пути их преобразования и выведения. Однако, условия *in vitro* не позволяют воспроизвести в полной мере комплексный ответ целостного организма на воздействие наночастиц. Дополнительным тестом, позволяющим принять первичное решение о безопасности дальнейшего применения наночастиц в клинических условиях можно рассматривать оценку изменений со стороны клинической картины крови в условиях нахождения наночастиц в организме. В условиях негативного влияния наночастиц происходят функциональные изменения в периферической крови (как в одной из наиболее лабильных систем организма), которые носят, как правило, неспецифический характер, отражая в то же время системные процессы, происходящие в организме.

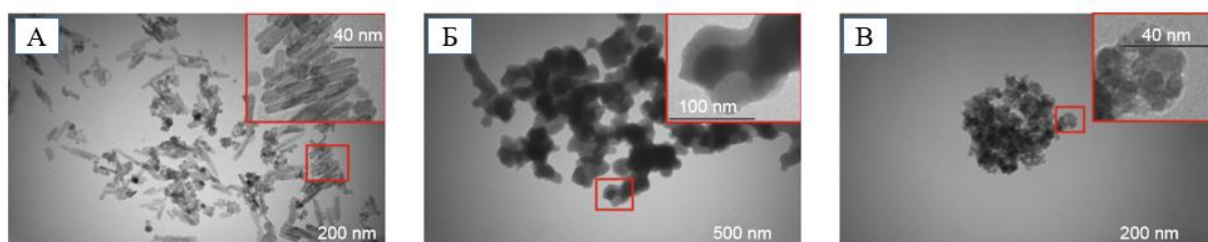
В связи с вышеизложенным, ранний скрининг различных видов наночастиц оксида железа (МНЧ) на предмет возможности их дальнейшего использования в медицинской практике основывался на изучении отдельных параметров биосовместимости МНЧ в различных модельных системах – *in vitro* (исследование цитотоксических эффектов немодифицированных МНЧ при их культивировании с эндотелиальными клетками, которые были выбраны в качестве клеток-мишеней исходя из планируемого клинического использования МНЧ с внутрисосудистым введением) и *in vivo* (исследование динамики показателей периферической крови крыс при однократном внутривенном введении немодифицированных МНЧ).

Для выбора наиболее перспективных кандидатов МНЧ для дальнейшей разработки исследовали профиль биологической активности немодифицированных МНЧ трех видов: наночастицы магнетита (МНЧ1) и композитные наночастицы на основе оксида железа и диоксида кремния: 1). с оболочкой из диоксида кремния и 2). с ядром из диоксида кремния (МНЧ2 и МНЧ3, соответственно). Необходимость получения композитных наночастиц на основе оксида железа и диоксида кремния двумя различными способами была обусловлена недостаточной устойчивостью образцов, синтезируемых с использованием предварительно полученного порошка кремнезема (т.е. с ядром из кремнезема) к агрегации [330].

### **3.1 - Физико-химические свойства немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава**

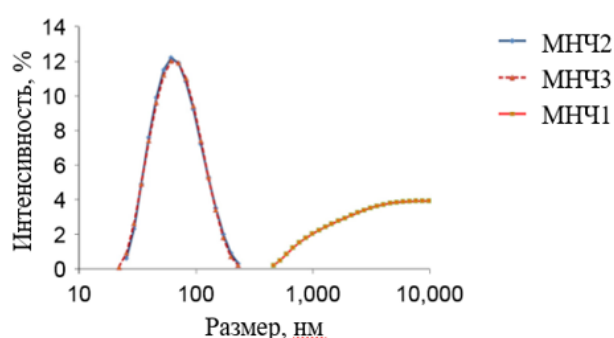
МНЧ1 имели форму стержней со средними размерами  $10,5 \pm 2,57$  нм (диаметр) и  $42,7 \pm 6,82$  нм (длина) (*рисунок 17 А*), тогда как МНЧ2 и МНЧ3 были сферической формы со средним диаметром  $98,0 \pm 22,00$  и  $101,0 \pm 19,00$  нм, соответственно (*рисунок 17 Б,С*).





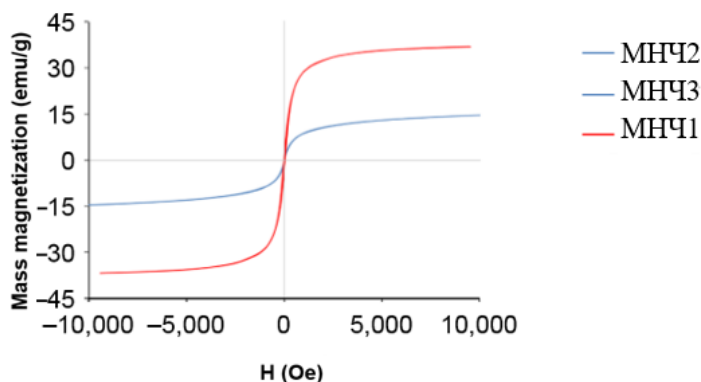
**Рисунок 17 - Изображения немодифицированных магнитных наночастиц, полученных с помощью электронной микроскопии**  
*Примечание: А. МНЧ1; Б. МНЧ2; В. МНЧ3.*

Гидродинамические размеры не различались у МНЧ2 и МНЧ3 и не демонстрировали агрегацию, в то время как МНЧ1 характеризовались значительной агрегацией, не позволившей оценить их размер с помощью динамического рассеяния света, поскольку данный метод применим для частиц гидродинамическим размером менее 10 мкм (*рисунок 18*).



**Рисунок 18 - Гидродинамический размер магнитных наночастиц, измеренный с помощью динамического рассеяния света**

Массовая намагниченность насыщения композитных наночастиц (МНЧ2 и МНЧ3) оценивалась в 11,0 етм/г (*рисунок 19*), тогда как наночастицы магнетита (МНЧ1) характеризовались массовой намагниченностью насыщения, равной 37,2 етм/г.



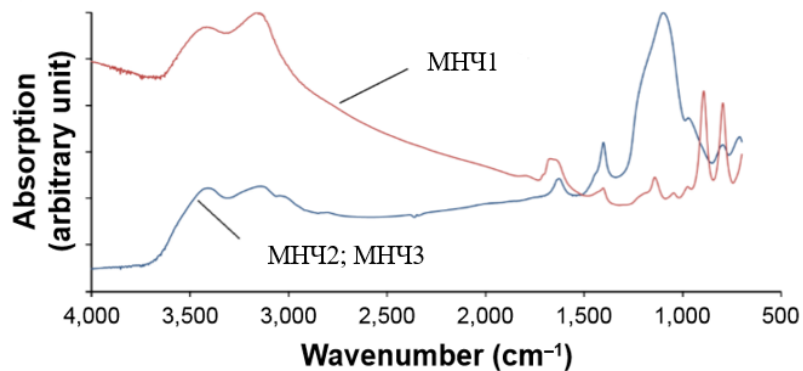
**Рисунок 19 - Кривые намагничивания магнитных наночастиц при комнатной температуре**

*Примечание:* MNЧ1 - наночастицы магнетита; MNЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; MNЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния.

Относительно низкая намагниченность массы насыщения композитных наночастиц, вероятно, объясняется наличием немагнитных включений кремнезема. Отсутствие петли гистерезиса на кривых намагничивания для всех трех типов наночастиц указывает на суперпарамагнитное поведение наночастиц.

ИК-Фурье спектры образцов MNЧ продемонстрировали, что все три вида MNЧ характеризовались восемью типичными пиками при 700, 800, 900, 1100, 1400, 1660, 3100 и 3400  $\text{cm}^{-1}$  (рисунок 20), что свидетельствует о том, что оксид железа присутствует во всех MNЧ в одной и той же кристаллической фазе, то есть магнетит и / или маггемит.

ИК-спектры композитных наночастиц показали поглощение при 1100  $\text{cm}^{-1}$ , что можно объяснить асимметричным колебательным растяжением мостиков Si-O-Si. Наночастицы магнетита характеризовались пиком около 3100  $\text{cm}^{-1}$  из-за вибрации в режиме растяжения O-H.



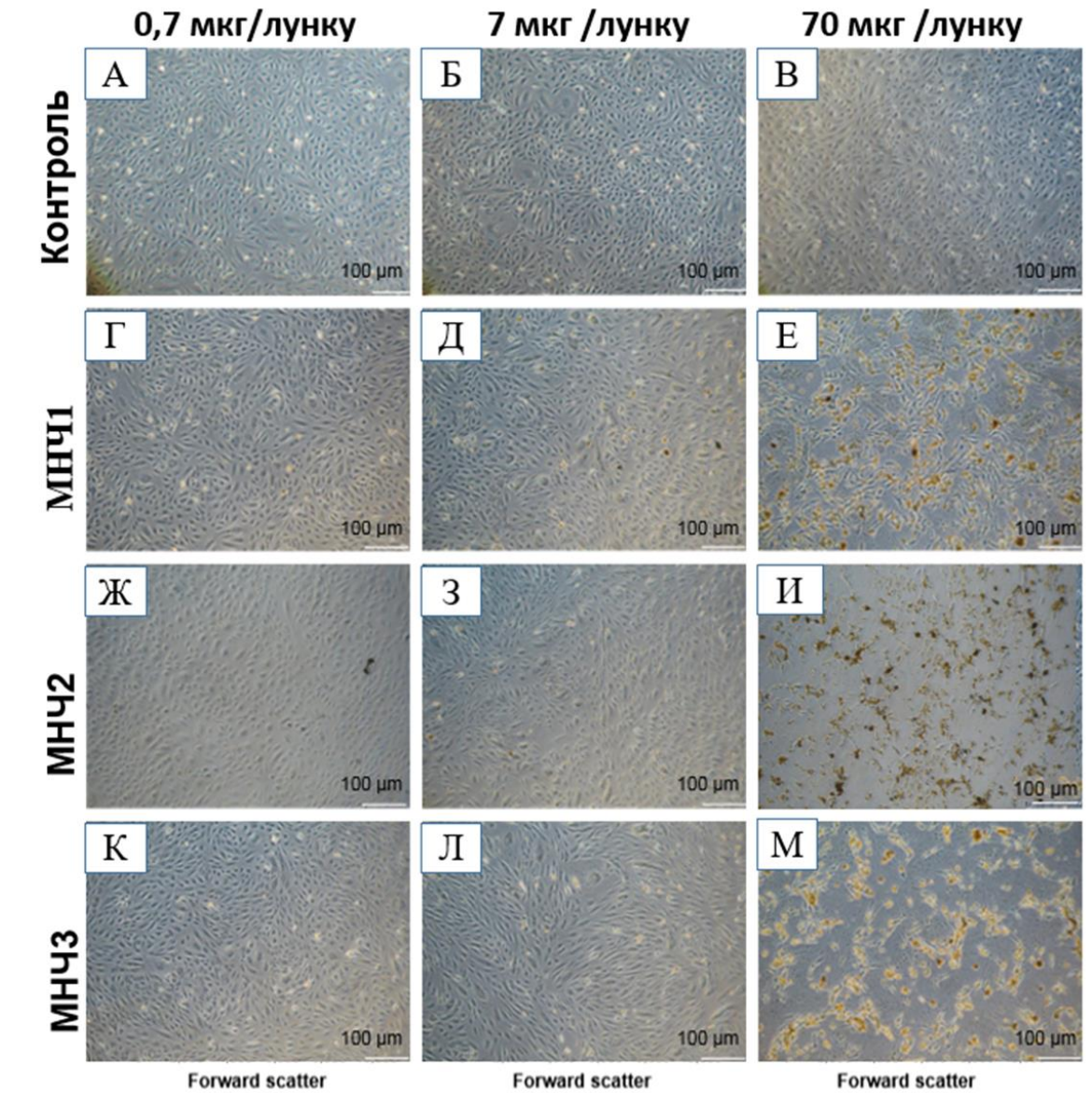
**Рисунок 20 - Спектры немодифицированных магнитных наночастиц, полученных с помощью инфракрасной Фурье спектроскопии**  
*Примечание:* МНЧ1 - наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния.

### **3.2 - Морфология и жизнеспособность эндотелиоцитов человека и показатели периферической крови крыс в условиях воздействия немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава**

В группе контроля через 48 часов после добавления в культуру клеток физиологического раствора (ФР) изменений со стороны морфологии клеток не наблюдалось (*рисунок 21 А-В и 22 А-В*).

В дозе 0,7 мкг/лунку МНЧ не оказывали влияния на размер и структуру клеток (*рисунок 21 Г, Ж,К и 22 Г,Ж и К*), однако увеличение дозы МНЧ до 7,0 мкг/лунку приводило к значительным изменениям морфологии и гранулярности клеток без изменений их размера (*рисунок 22 Д,З,Л*), наблюдалось образование внеклеточных агрегатов наночастиц различной формы и размера (*рисунок 21 Д,З,Л*).

При воздействии всех видов МНЧ в дозе 70,0 мкг/лунку визуализировалось большое количество конгломератов частиц, клетки наблюдались в единичных количествах (*рисунок 21 И,М и 22 И,М*).

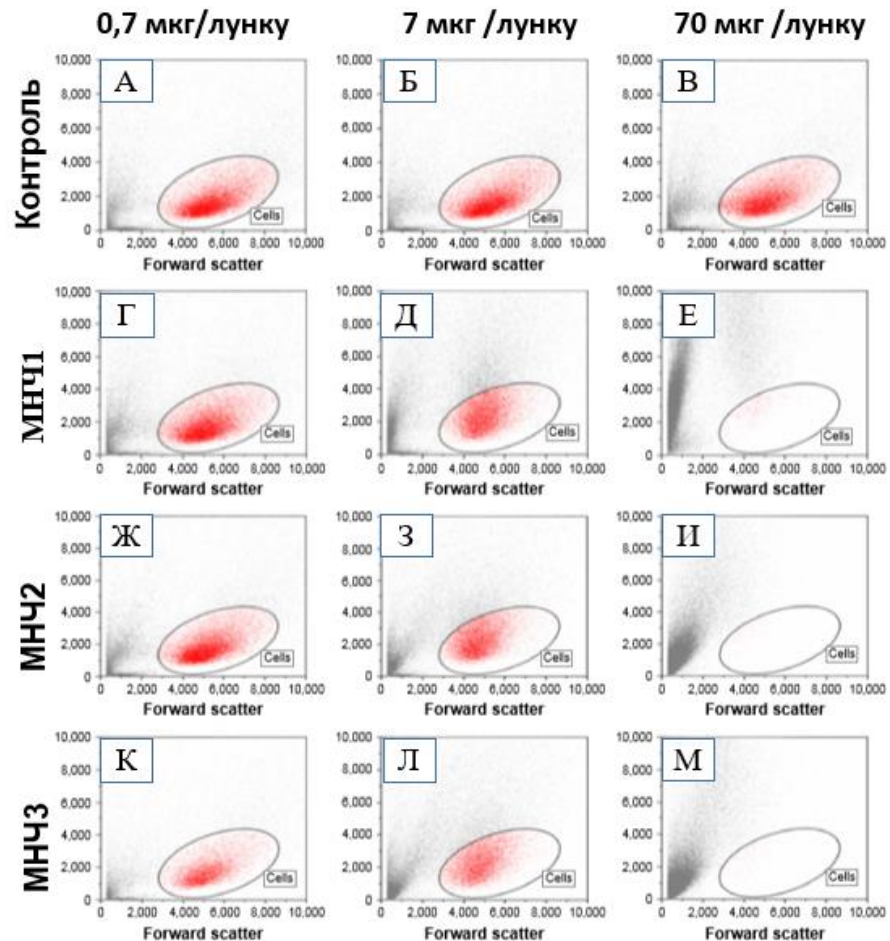


**Рисунок 21 - Морфологическая картина эндотелиальных клеток через 48 часов инкубации с различными дозами немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* МНЧ1 - наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния. А, Б, В. Группы контроля с использованием физиологического раствора в различных объемах; Г, Д, Е. Группы с использованием наночастиц магнетита в различных дозах; Ж, З, И. К, Л, М. Группы с использованием композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния в различных дозах; К, Л, М. Группы с использованием композитных наночастиц с ядром из диоксида кремния в различных дозах. Ув. × 50.

Наиболее выраженными изменения были при применении МНЧ3, наименее выраженными - при действии МНЧ1. При воздействии МНЧ1 в зоне

гейтирования фиксировался остаточный клеточный пул уменьшенного размера и значительно увеличенной гранулярностью, что может быть признаком включения МНЧ в цитоплазму (рисунк 22 E).



**Рисунок 22 - Изменение морфологии и гранулярности клеток HUVES через 48 часов инкубации с наночастицами (оригинальные данные проточной цитометрии)**

*Примечание:* МНЧ1 - наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния. А, Б, В. Группы контроля с использованием физиологического раствора в различных объемах; Г, Д, Е. Группы с использованием наночастиц магнетита в различных дозах; Ж, З, И. К, Л, М. Группы с использованием композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния в различных дозах; К, Л, М. Группы с использованием композитных наночастиц с ядром из диоксида кремния в различных дозах.

Для оценки влияния МНЧ на процесс цитокинеза проводили подсчет количества двуядерных клеток при использовании МНЧ в низкой и средней

дозах. В контроле двухъядерных клеток не наблюдалось, в то время как воздействие МНЧ на HUVEC приводило к их появлению, возможно, из-за нарушения цитокинеза. Все виды наночастиц вызывали дозозависимое увеличение количества двухъядерных клеток (таблица 13). Наиболее выраженный эффект при использовании минимальных доз МНЧ оказывали МНЧ1 и при использовании МНЧ в дозах 7,0 мкг/лунку – МНЧ3.

Одной из возможных причин снижения жизнеспособности клеток с увеличением дозы наночастиц может быть активная интернализация наночастиц и перенасыщение ими клеток, что, в свою очередь, индуцирует генерацию активных форм кислорода (АФК), повреждение мембран, нарушение функции митохондрий и т.д., обуславливая в конечном счете повреждение клетки [74, 93].

**Таблица 13 - Количество двухъядерных эндотелиальных клеток через 48 часов инкубации с немодифицированными магнитными наночастицами**

Доза/вид наночастиц/лунку	МНЧ1	МНЧ2	МНЧ3
0,7 мкг/лунку	2,8±1,16*	0,8±0,49	1,6±0,75
7 мкг/лунку	3,2±0,74	3,0±0,63**	4,0±0,62**

*Примечание:* МНЧ1 - наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния. \*Р < 0,05 между МНЧ1 и МНЧ2; \*\*Р < 0,05 по сравнению с дозой 0,7 мкг.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наилучшим профилем биосовместимости обладали наночастицы магнетита (МНЧ1). Несмотря на их игольчатую форму, меньший размер, а также относительно низкую агрегативную устойчивость (по сравнению с композитными наночастицами), относительно низкая токсичность МНЧ1, по-видимому, обусловлена тем, что чистый оксид железа (магнетит), являясь естественным метаболитом, сам по себе обладает крайне низкой токсичностью. Также, в

технологическом процессе синтеза МНЧ1 не используются потенциально токсичные агенты. Образцы композитных наночастиц (МНЧ2 и МНЧ3) могут обладать большей агрегативной и химической устойчивостью, однако не подвергаются термообработке и поэтому содержат остатки кремнийорганических соединений, потенциально способных оказывать токсический эффект.

Высокая токсичность МНЧ3 может быть объяснена окислением магнетита до маггемита и гематита [2], а также отсутствием инертной оболочки на поверхности оксидных наночастиц. В соответствии с этим предположением, композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния демонстрировали меньшее токсическое действие. При этом присутствие в коллоидном растворе композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния остатков тетраэтоксисилана может являться причиной большего токсического действия по сравнению с наночастицами магнетита.

Для исследования влияния наночастиц на показатели периферической крови крыс животным внутривенно вводили суспензию МНЧ, приготовленную на ФР и содержащую максимально возможное количество наночастиц, не вызывающее при болюсном введении механической закупорки сосуда. Такая концентрация составила 0,7 мг МНЧ в 1 мл. Статистические показатели периферической крови крыс всех экспериментальных групп в динамике эксперимента представлены в таблице 14. Однократное внутривенное введение крысам 0,7 мг МНЧ1, МНЧ2 и МНЧ3 не приводило к значимым изменениям со стороны периферической крови животных, о чем свидетельствовали гематологические показатели крыс, находящиеся в динамике эксперимента в пределах физиологической нормы. Данный факт косвенно свидетельствует об отсутствии выраженных острых системных токсических эффектов всех видов немодифицированных наночастиц на основе железа. Незначительные колебания отдельных показателей являлись следствием влияния условий эксперимента, а также, возможно, временным ответом организма животных на введение МНЧ.

**Таблица 14 - Показатели периферической крови крыс через 3, 6 и 24 часа после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Часы	Показатель	ФР	МНЧ1	МНЧ2	МНЧ3
3	Лейкоциты, WBC, г/л	9,4 [8,3;12,0]	9,9 [7,0;11,9]	13,0 [12,3;16,5]	11,8 [9,8;12,5]
6		10,2 [8,3;12,1]	9,7 [8,5;12,7]	12,0 [9,4;16,9]	7,3 [6,7;9,1]
24		10,5 [10,0;11,0]	9,3 [8,3;11,3]	11,2 [9,1;12,4]	9,1 [8,2;11,7]
3	Гранулоциты, Gr%	31,8 [29,3;32,4]	34,0 [32,4;38,1]	40,5 [34,5;56,3]	38,2 [30,6;42,3]
6		28,8 [27,1;32,4]	38,7 [29,7;40,4]	44,6 [38,3;54,5]*	38,2 [30,6;42,3]
24		30,0 [28,0;32,4]	29,6 [27,8;44,3]	24,4 [18,5;34,3]	33,1 [28,3;32,4]
3	Моноциты, Mи%	0,6 [0,6;0,6]	11,2 [10,0;13,0]*/\$	10,0 [6,1;13,8]*	8,6 [4,6;10,1]*
6		1,0 [0,6;1,0]	11,7 [11,1;12,3]*	6,9 [5,7;10,2]*	9,7 [7,0;12,3]*
24		0,9 [0,6;1,0]	2,8 [0,7;5,5]*/**/\$	11,6 [10,5;12,6]*/**	8,6 [5,0;12,1]*
3	Лимфоциты, Lym%	68,7 [66,9;71,9]	57,6 [54,8;70,7]	51,8 [37,7;58,9]	49,6 [38,3;52,5]*
6		70,2 [50,4;71,9]	50,2 [47,3;69,7]	45,9 [37,1;54,2]*	52,1 [45,4;55,6]
24		68,9 [51,0;71,0]	64,1 [51,0;65,0]	62,7 [55,0;69,3]	58,9 [50,1;63,1]
3	Эритроциты, RBC, 10 <sup>12</sup> /л	6,2 [6,2;6,6]	8,3 [7,3;8,7]*	7,5 [7,1;8,2]*	7,1 [6,8;7,2]*
6		6,2 [6,0;7,1]	7,8 [6,9;8,1]	6,8 [5,8;7,5]	8,1 [7,2;8,5]
24		6,6 [6,2;7,1]	6,8 [6,5;6,8]	9,1 [8,4;12,4]	6,3 [6,0;6,7]
3	Среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCH,pg	20,7 [20,6;20,9]	19,5 [19,4;19,6]	20,6 [19,7;21,0]	19,6 [19,6;21,2]
6		22,5 [20,4;24,5]	20,7 [20,7;20,8]	20,6 [19,9;21,3]	20,5 [19,6;21,0]
24		21,0 [17,9;22,3]	21,5 [20,4;21,6]	20,3 [20,2;20,8]	20,6 [20,5;20,8]
3	Средний объем эритроцита, MCV,fl	72,0 [71,0;73,0]	66,0 [66,0;68,0]	69,0 [66,0;72,0]	67,0 [66,0;74,0]
6		74,0 [70,0;75,0]	70,0 [69,0;71,0]	71,0 [69,0;73,0]	70,0 [67,0;71,0]
24		72,0 [70,0;74,0]	70,0 [69,0;72,0]	71,0 [70,0;72,0]	72,0 [71,0;72,0]



3	Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, МСНС, г/л	287,0 [286,0;288,0]	292,0 [290,0;297,0]	298,0 [293,0;300,0]	291,0 [286,0;294,0]
6		290,0 [288,0;292,0]	297,0 [292,0;300,0]	291,0 [288,0;293,0]	294,0 [288,0;296,0]
24		285,0 [282,0;288,0]	293,0 [291,0;298,0]	287,0 [284,0;294,0]	286,0 [285,0;287,0]
3	Гемоглобин, Hb, г/л	130,0 [127,0;138,0]	161,0 [153,0;171,0]*	160,0 [146,0;170,0]*	145,0 [141,0;146,0]*
6		132,0 [127,0;141,0]	162,0 [143,0;168,0]	141,0 [131,0;158,0]	165,0 [154,0;170,0]*
24		130,0 [126,0;139,0]	147,0 [145,0;152,0]	142,0 [133,0;170,0]	131,0 [122,0;139,0]
3	Гематокрит, HCT,%	45,6 [44,4;48,2]	56,8 [52,5;59,5]*	51,0 [49,9;56,3]	49,8 [47,7;50,7]
6		45,5 [43,7;47,2]	55,3 [48,8;57,7]	47,1 [41,4;50,3]	57,4 [51,8;57,9]*
24		48,3 [42,2;50,3]	48,7 [46,6;50,0]	47,7 [47,4;50,3]	45,7 [42,8;48,5]
3	Тромбоциты, PLT, 10 <sup>12</sup> /л	545,6 [539,1;581,1]	561,5 [541,5;587,1]	555,2 [544,1;578,1]	557,9 [537,1;583,0]
6		551,1 [529,8;567,0]	538,4 [524,8;579,3]	567,1 [543,7;584,3]	548,6 [524,8;584,2]
24		497,5 [437,3;537,0]	498,9 [447,3;536,4]	483,4 [445,0;524,8]	480,1 [454,7;548,0]

*Примечание:* МНЧ1 - наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния. \*P < 0,05 по сравнению с контролем; \*\*P < 0,05 между опытными группами; \$P < 0,05 между показателями внутри группы.

Отсутствие выраженных изменений со стороны клинической картины крови позволяет сделать предварительный вывод о потенциальной возможности их использования в биомедицинских целях.

Таким образом, проведенный скрининг эффектов немодифицированных наночастиц оксида железа показал, что при однократном внутривенном введении суспензии всех видов наночастиц из расчета 0,7 мг на животное не наблюдалась острая системная токсичность в виде изменений показателей периферической крови крыс. Тем не менее, в отношении эндотелиоцитов все виды исследованных наночастиц демонстрируют дозозависимые цитотоксические эффекты, выраженность которых зависит от их состава. Наиболее значительным повреждающим эффектом в отношении

эндотелиальных клеток человека обладают композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния (МНЧ3). В связи с этим в следующих сериях экспериментов были использованы наночастицы магнетита (МНЧ1) и композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2).

На основании проведенного анализа результатов, полученных в ходе данного этапа исследования, в следующие серии экспериментов были включены наночастицы магнетита и композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния, использование которых может явиться оптимальным решением при разработке технологии магнитоуправляемой доставки лекарственных препаратов к участку локализации патологического процесса.

### **3.3 - Исследование влияния немодифицированных наночастиц оксида железа в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз и агрегацию эритроцитов и продукцию активных форм кислорода**

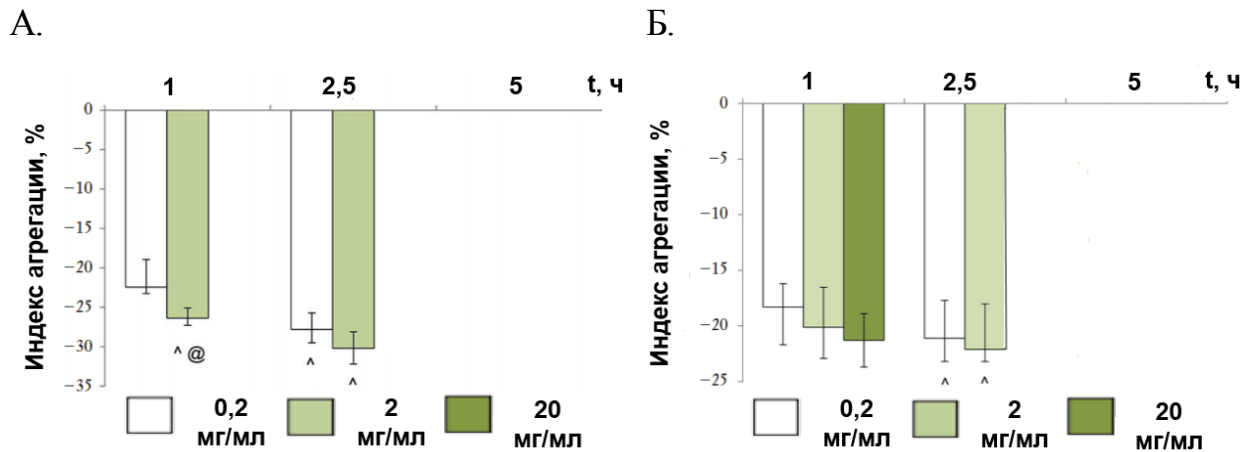
Для определения безопасности взаимодействия наночастиц с клетками крови, необходимо оценить их гемолитическую активность. С учетом общеизвестного факта, что гемолитическая активность большинства наночастиц зависит от их концентрации, структуры, размера, формы и множества других физико-химических характеристик, оценка гемолитической активности наночастиц на сегодняшний день рассматривается как базовый тест для выявления их взаимодействия с эритроцитами [144]. При этом, с учетом возможного участия свободно-радикального механизма в реализации гемолиза эритроцитов в условиях воздействия наночастиц [292, 293], особый интерес представляет исследование генерации активных форм кислорода (АФК) в условиях их воздействия.

В связи с вышеизложенным, в рамках исследования взаимодействия немодифицированных наночастиц (МНЧ1 – наночастицы магнетита и МНЧ2 - композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния) с кровью

человека проводили исследование их дозозависимого влияния на продукцию АФК, агрегативную устойчивость эритроцитов, спонтанный гемолиз, а также с учетом участия белковой короны, образующейся при попадании МНЧ в кровотоки, на их взаимодействие с компонентами крови, исследовали процесс формирования белкового слоя на поверхности наночастиц. Эксперименты проводили на образцах гепаринизированной крови человека, к которым в соотношении 1:1 добавляли суспензию МНЧ1 или МНЧ2 в концентрациях 0,2, 2,0 и 20,0 мг/мл. Непосредственно перед проведением исследования под дно пробирки на 3 минуты устанавливали постоянный магнит для изоляции МНЧ из взвеси. Общее количество эритроцитов в контрольных и опытных образцах после осаждения МНЧ не различалось ( $p > 0,05$  между группами). Данный факт свидетельствовал об отсутствии возможного осаждения из инкубационной взвеси эритроцитов, ассоциированных с наночастицами и отсутствии возможности изменения индекса агрегации эритроцитов (ИАЭ) за счет изменения их концентрации в среде, а не под влиянием наночастиц.

Во всех исследуемых группах через 5 часов инкубации отмечался гемолиз, не позволивший провести оценку ИАЭ (*рисунок 23 А,Б*).

В условиях 2,5-часового воздействия МНЧ1 и МНЧ2 наблюдалось снижение степени агрегации эритроцитов, при этом МНЧ1 обладали более выраженным эффектом. Через 5 часов инкубации при использовании всех доз МНЧ отмечался гемолиз, не позволивший провести адекватную оценку ИАЭ.



**Рисунок 23 - Изменение агрегации эритроцитов под влиянием немодифицированных магнитных наночастиц**

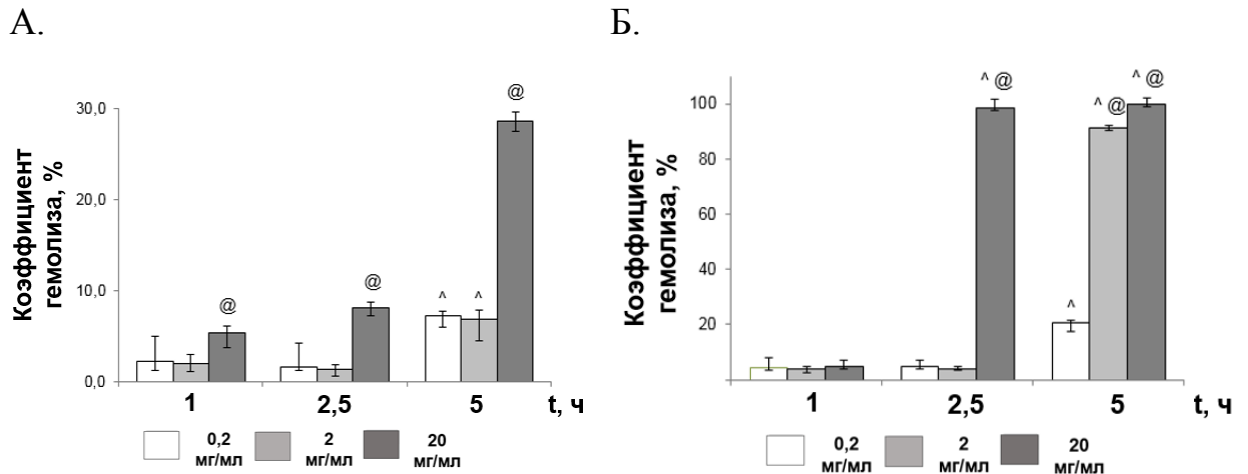
*Примечание:* А. МНЧ1; Б. МНЧ2. Примечание: ^P < 0,05 между МНЧ1 и МНЧ2 одной концентрации; @P < 0,05 по сравнению с меньшей концентрацией МНЧ того же типа.

В диапазоне концентраций 0,2–2,0 мг/мл при 2,5-часовой инкубации МНЧ1 и МНЧ2 не вызывали разрушения эритроцитов (*рисунок 24 А,Б*).

С увеличением времени инкубации наблюдалось усиление их гемолитического эффекта, при этом МНЧ2 оказывали наиболее выраженное воздействие.

В условиях 2,5-часового воздействия наночастиц в дозе 20,0 мг/мл в группе МНЧ1 наблюдался незначительный гемолитический эффект (8%), который на момент окончания эксперимента увеличивался до 28,7%, при этом в группе МНЧ2 уже после 2,5 часового воздействия практически все эритроциты (98%) подвергались гемолизу.

Для исследования возможной роли свободно-радикального механизма в реализации гемолитического эффекта МНЧ проводили эксперименты с оценкой динамики величины хемилюминесценции (ХЛ) крови, как показателя общего уровня АФК, в условиях воздействия наночастиц.



**Рисунок 24 - Коэффициент спонтанного гемолиза в условиях воздействия немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* А. MNCh1; Б. MNCh2. Примечание: <sup>^</sup>P < 0,05 между MNCh1 и MNCh2 одной концентрации; <sup>@</sup>P < 0,05 по сравнению с меньшей концентрацией MNCh того же типа.

В образцах группы с использованием физиологического раствора (ФР) через 1 час инкубации наблюдали достоверное повышение параметров ХЛ крови ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным). Показатели максимальной интенсивности свечения  $I_{\max}$  и полной светосуммы  $S$  на данном этапе эксперимента составили 30,17 [17,54;31,45] имп/с и 15371,79 [12888,70;18840,74] о.е., соответственно (таблица 15). Достоверно более высокие значения данных показателей в группе контроля сохранялись в динамике всего эксперимента, что, вероятно, обусловлено экспериментальными условиями [102]. Непосредственно после добавления 0,2 мг/мл MNCh1 и MNCh2 наблюдали достоверно более высокий уровень ХЛ по сравнению с контролем, который затем в динамике инкубации снижался. Через 5 часов в группе MNCh1 показатели ХЛ снижались до контрольного

уровня и составили: 18,91[18,49;19,33] имп/с ( $I_{\max}$ ), 5887,48[5152,13;6622,83] о.е. (S), а в группе МНЧ2 достигали достоверно более низких значений по сравнению с контролем ( $I_{\max}$  и S для данной группы составили 9,15[8,52;9,77] имп/с и 3178,85[3061,36;3296,34] о.е, соответственно). С увеличением концентрации МНЧ представленная динамика хемиллюминесценции в течение эксперимента сохранялась.

На фоне повышения концентрации МНЧ до 20,0 мг/мл и времени их воздействия наблюдалось снижение генерации АФК, при этом МНЧ2 оказывали достоверно больший эффект в сравнении с МНЧ1 (после 5 часов инкубации  $I_{\max}$  и S для данных групп составили: 8,52[5,32;11,88] имп/с и 2715,77[2128,37;4058,52] о.е. (МНЧ1-20) и 2,01[1,66;2,35] имп/с и 667,48[569,60;765,36] о.е. (МНЧ2-20).

**Таблица 15 - Динамика показателей хемилюминесценции цельной крови в условиях воздействия немодифицированных магнитных наночастиц**

Максимальная интенсивность свечения, I <sub>max</sub> , имп/с				
Группа	Исх.	1 час	2,5 часа	5 часов
ФР	6,25[2,86; 6,43]	30,17[17,54;31,45]*	28,60 [27,02;30,17]*	20,41 [15,17;25,65]*
МНЧ1-0,2	13,81[12,13;15,50] **/^	32,71[30,99;37,21]*	26,34[24,85;27,82]*/#	18,91[18,49;19,33]*/#
МНЧ1-2,0	11,98[11,62;12,33]**	12,33[10,44;13,11]@	18,44[18,29;18,60]@	12,35[11,39;13,32]@
МНЧ1-20	1,66[1,43;2,38]**	9,59[8,96;10,21]*/**	10,12[9,89;10,35]*/**	8,52[5,32;11,88]*/**
МНЧ2-0,2	9,22[5,72;12,72] **/^	13,50[12,15;14,85]**/^	24,20[23,81;29,47]*/#	9,15[8,52;9,77]**
МНЧ2-2	11,07[6,02;16,12]**	12,63[9,20;16,06]**	17,63[16,06;20,14]@/**	11,25[10,98;11,53]**
МНЧ2-20	3,90[2,46;11,65]	10,36[9,06;11,65]**	10,11[8,00;15,72]**	2,01[1,66;2,35]**/^
Полная светосумма, S, о.е.				
ФР	828,53[695,79;1557,78]	15371,79[12888,70;18840,74]*	12327,14[11765,57;12888,70]	6102,69[4229,13;7976,25]
МНЧ1-0,2	2803,34[1980,17;3626,51] **	8118,49[7776,66;9330,79] **	9717,43[8855,82;10579,05]	5887,48[5152,13;6622,83]
МНЧ1-2,0	3875,80[2715,75;5035,84]	5035,84[4849,03;5794,36] @	5130,76[4937,13;5241,31] @	4397,94[4214,31;4581,57] @
МНЧ1-20	478,93[456,05;653,50] ^	3328,39[3291,60;3365,18] @	3953,75[3703,21;4204,29] @	2715,77[2128,37;4058,52] @
МНЧ2-0,2	2013,14[1385,77;2640,51]	5382,44[5125,65;5639,24]	10036,34[7302,20;11932,37]	3178,85[3061,36;3296,34]

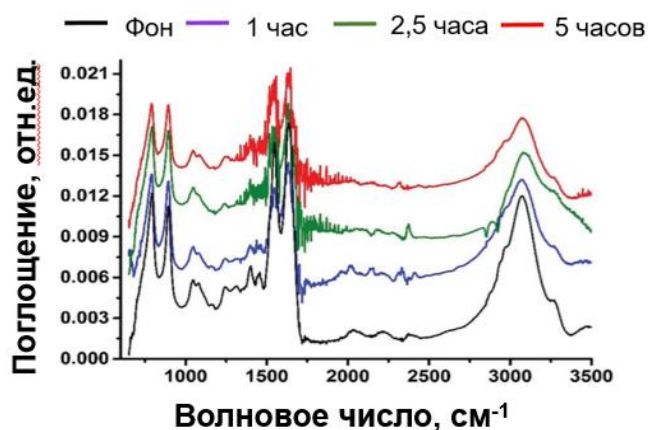
МНЧ2-2	4241,76[1895,75;6587,77] **	4918,03[3792,51;6043,54] **	6208,53[6043,54;6862,96] **	3109,69[2671,90;3547,47] **
МНЧ2-20	957,41[704,18;1210,64] ^@	3844,87[3536,11;4153,63] **	3626,95[2253,50;4298,76] **/@	667,48[569,60;765,36] **/^@

*Примечание:* ФР – группа с использованием физиологического раствора; МНЧ1-0,2, МНЧ1-2,0, МНЧ1-20,0 – группы с использованием наночастиц магнетита в дозах 0,2, 2,0 и 20,0 мг/мл, соответственно; МНЧ2-0,2, МНЧ2-2,0, МНЧ2-20,0 – группы с использованием композитных наночастиц с ядром из диоксида кремния в дозах 0,2, 2,0 и 20,0 мг/мл, соответственно. P < 0,05 по сравнению с исходными значениями; \*\*P < 0,05 по сравнению с контролем; ^P < 0.05 между МНЧ1 и МНЧ2 одной концентрации; #P < 0,05 по сравнению с предыдущей дискретной точкой; @P < 0,05 по сравнению с меньшей концентрацией наночастиц того же типа.

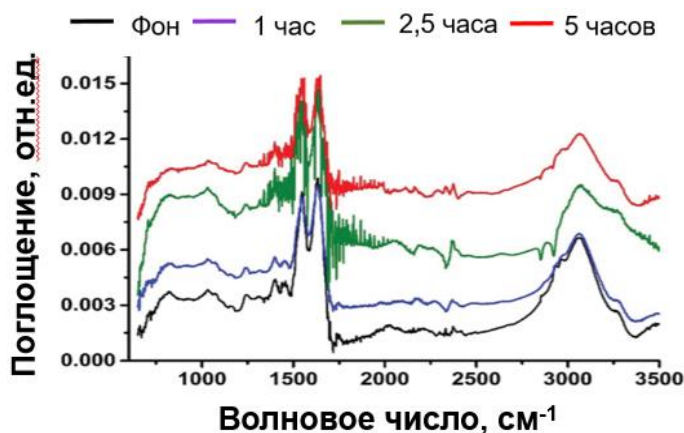


Результаты спектров образцов МНЧ, полученных с помощью инфракрасной Фурье спектроскопии (рисунк 25 А,Б) соответствовали набору характеристических пиков, характерных для образцов крови [182] с выраженными изменениями в спектральном диапазоне 3000–3300 см<sup>-1</sup>, отражающими наличие на поверхности МНЧ альбумина. В динамике инкубации наблюдалось изменение соотношения интенсивностей обозначенных колебаний для МНЧ1 и МНЧ2.

А.



Б.



**Рисунок 25 - Спектры образцов крови, инкубированных с немодифицированными магнитными наночастицами, полученные с помощью инфракрасной Фурье спектроскопии**

*Примечание:* А. Наночастицы магнетита (МНЧ1); Б. Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2).

Данные изменения ИК-Фурье спектров, предположительно, обусловлены конформационными изменениями белка при формировании белковой короны в процессе инкубации [348] и/или увеличением его количества.

В ходе исследования показано, что синтезированные различными способами МНЧ (МНЧ1 и МНЧ2) обеспечивают дозо- и время зависимое снижение спонтанной хемилюминесценции (ХЛ) цельной крови человека в динамике инкубации (при увеличении концентрации МНЧ и времени их воздействия наблюдается усиление эффекта). Наиболее выраженное снижение ХЛ наблюдалось в условиях влияния МНЧ2. Данное снижение может быть обусловлено снижением генерации АФК [178, 219], вероятно, связанным с постепенным снижением реакционной способности наночастиц в процессе инкубации вследствие формирования на их поверхности оболочки, состоящей из белков. Также в качестве другой вероятной причины снижения ХЛ можно рассматривать компенсаторную активацию антиоксидантных систем плазмы крови в ответ на первоначальное воздействие МНЧ при их добавлении в инкубационную среду. При этом нельзя не принимать во внимание и возможность связывания самими МНЧ свободных радикалов, а также их стимулирующее влияние на ферменты антиоксидантных систем плазмы.

При исследовании гемолитической активности МНЧ было установлено, что МНЧ1 и МНЧ2 в диапазоне концентраций 0,2–2,0 мг/мл при 2,5 часовой инкубации не вызывают разрушения эритроцитов. Однако, с увеличением времени инкубации наблюдается усиление их гемолитического эффекта, при этом композитные наночастицы (МНЧ2) оказывают более выраженное воздействие в части разрушения эритроцитов. Можно предположить, что усиление гемолитического эффекта в условиях длительного 5-ти часового воздействия наночастиц обусловлено за счет постепенного ослабления механической прочности плазматической мембраны эритроцитов и уменьшению ее эластичности и/или конформационных перестроек гемоглобина в условиях воздействия наночастиц на эритроциты [6].

При изучении влияния МНЧ на агрегацию эритроцитов было установлено снижение степени агрегации эритроцитов в условиях их 2,5 часового воздействия, при этом МНЧ1 оказывали более выраженный эффект по сравнению с МНЧ2. Гипоагрегационный эффект МНЧ может быть связан с адсорбцией на поверхности МНЧ белков с формированием «белковой короны». Данное предположение подтверждается результатами, полученными при изучении кинетики формирования белкового слоя на поверхности МНЧ. При этом, с течением времени количество адсорбированного белка на поверхности МНЧ увеличивается, о чем свидетельствует рост значений максимумов поглощения спектров ИК-Фурье в динамике эксперимента, что, предположительно, и вызывает снижение агрегации эритроцитов. В этом случае можно предположить, что взаимодействие белков с поверхностью МНЧ1 является более выраженным по сравнению с МНЧ2. Также нельзя исключать и влияние на степень агрегации эритроцитов изменения заряда форменных элементов крови при взаимодействии МНЧ с плазменными белками. Следует отметить, что продемонстрированный гипоагрегационный эффект МНЧ нельзя рассматривать как токсический/лизирующий эффект на эритроциты, то есть реализуемый за счет уменьшения их количества в среде. В пользу данного утверждения свидетельствует отсутствие гемолитического эффекта у МНЧ в концентрациях 0,2-2,0 мг/мл.

Несмотря на игольчатую форму МНЧ, их меньший размер, а также более низкую агрегативную устойчивость по сравнению с МНЧ2, наночастицы данного типа оказывают наименее выраженное токсическое воздействие на клетки крови. Можно предположить, что данный факт обусловлен более интенсивным связыванием альбумина на поверхности МНЧ1 и их агрегированием из-за отсутствия защитной оболочки. После быстрого формирования «белковой короны» на поверхности МНЧ1, последние становятся биологически инертными, в отличие от МНЧ2, оболочка которых препятствует агрегации наночастиц, а также может содержать остатки кремнийорганических соединений.

Таким образом, в условия *ex vivo* наночастицы магнетита (МНЧ1) и композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2) вызывают дозозависимый гемолиз эритроцитов, а также снижают спонтанную хемилюминесценцию цельной крови и агрегацию эритроцитов. МНЧ2 оказывают более выраженный по сравнению с МНЧ1 эффект в отношении снижения генерации активных форм кислорода (АФК) и разрушения эритроцитов.

#### **3.4 - Сократительная и релаксационная функции артерий в условиях введения крысам немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа**

Результаты исследования, проведенного на культуре эндотелиоцитов и подробно описанные в разделе 3.2, продемонстрировали токсический эффект высоких доз наночастиц в отношении эндотелиоцитов человека. Кроме того, была выявлена зависимость характера профиля токсичности МНЧ от характеристик, которые в существенной степени зависят от способа их синтеза.

В разделе 3.3 описаны результаты, подтверждающие факт формирования «белковой короны» на поверхности МНЧ, а также обсуждается возможная взаимосвязь между процессом ее формирования и характеристиками самих наночастиц.

Большинство работ, направленных на исследование взаимодействия различных видов наночастиц с эндотелием представлено исследованиями, выполненными в условиях *in vitro*. Однако данные условия не позволяют в полной мере учесть влияние на данное взаимодействие таких факторов, как гемодинамические условия, характерные для конкретного сосудистого региона, степень проницаемости сосудов [117, 229] и т.д. В связи с этим, можно предполагать возможность изменения биологических эффектов МНЧ в

условиях *in vivo* по сравнению с условиями *in vitro*. Данный факт определяет необходимость в рамках экспериментального исследования безопасности использования наночастиц в биомедицинских целях с планируемым внутрисосудистым введением, проведения исследований в условиях *in vivo*.

Таким образом, следующий этап исследования был направлен на исследование влияния синтезированных различными способами МНЧ на функциональное состояние эндотелия с оценкой сократительной и релаксационной функции сосудов.

Эксперименты проводили на изолированных сосудах брыжейки, полученных от крыс через 1 час после внутривенного введения 1,4 мг наночастиц магнетита (МНЧ1) и композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния) МНЧ2 в объеме 2 мл.

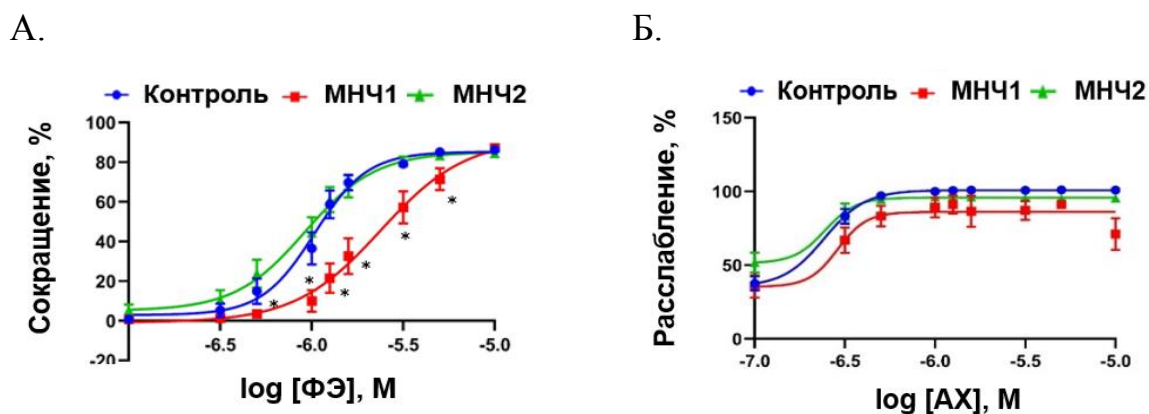
На фоне введения МНЧ1 отмечалось снижение реакции сосудов на фенилэфрин (ФЭ), используемый в диапазоне концентраций 1-3 мкМ (*рисунок 26 А,Б, таблица 16*). Введение МНЧ2 не вызывало значимых изменений характера сокращения сосудов (*рисунок 26 А,Б, таблица 16*). При использовании максимальной концентрации ФЭ (10 мкМ) сократительные ответы во всех экспериментальных группах не различались (*таблица 16*).

**Таблица 16 - Значения логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа LogEC50 и максимальной величины ответа Emax в группах с введением немодифицированных магнитных наночастиц**

Объект исследования	Агонист/показатель			
	ФЭ		АХ	
	LogEC50, М	Emax, %	LogEC50, М	Emax, %
Контроль	-5,98±0,04	86,21± 2,15	-6,61±0,07	102,24±0,72
МНЧ1	-5,62±0,07	81,14±6,30	-6,54±0,09	98,18±0,68
МНЧ2	-6,03±0,05	69,86±6,91	-6,61±0,18	98,83±2,17

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. ФЭ – фенилэфрин; АХ – ацетилхолин.

Значения логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа ( $\text{LogEC}_{50}$ ) и значение максимальной величины ответа ( $E_{\text{max}}$ ) для ацетилхолина (АХ) в группах МНЧ1 и МНЧ2 были близки по значению, не отличаясь при этом от значений в группе контроля.



**Рисунок 26 - Кумулятивная кривая «концентрация-ответ»**

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. ответ на воздействие фенилэфрина; Б. ответ на воздействие ацетилхолина. \*P < 0,0001.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния внутривенного введения МНЧ2 на сокращение и релаксацию малых мезентериальных артерий, тогда как введение МНЧ1 изменяет сократительную активность сосудов, не оказывая при этом влияния на эндотелий-зависимое расслабление.

Полученные результаты в отношении МНЧ2 имеют некоторое расхождение с данными, полученными ранее на культуре HUVEC, которое может быть обусловлено влиянием организменных факторов, в частности, взаимодействием МНЧ2 с белками крови с образованием белкового слоя на их поверхности, что могло нивелировать или снизить оказываемые негативные в отношении эндотелия эффекты МНЧ2 [109, 261].

В основе изменений сократительной активности сосудов при действии

МНЧ1 могут лежать различные механизмы, которые могут быть реализованы на пре-, рецепторном и пострецепторном уровнях формирования ответа на воздействие агониста. Нельзя исключить также возможность повреждающего влияния избыточного железо-опосредованного образования АФК при внутривенном введении МНЧ. Возможность механического повреждения стенки сосудов при вышеуказанном способе введения МНЧ1, характеризующихся игольчатой формой, маловероятна, поскольку релаксационная функция сосудов сохранялась.

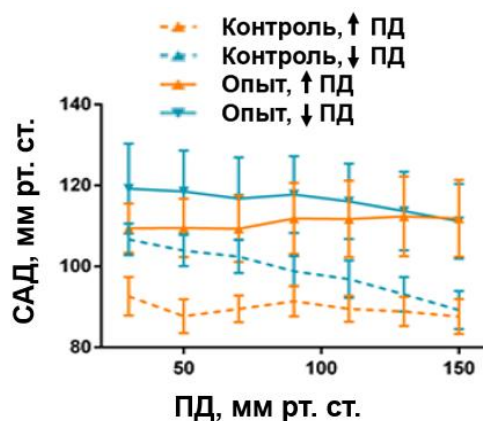
В связи с выявленным влиянием наночастиц магнетита на сократительную активность артерий данный вид наночастиц был применен при исследовании их сосудистых эффектов при внутривенном введении крысам в условиях изменяющейся скорости кровотока с оценкой сохранности механизмов его регуляции.

### **3.5 - Влияние внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока**

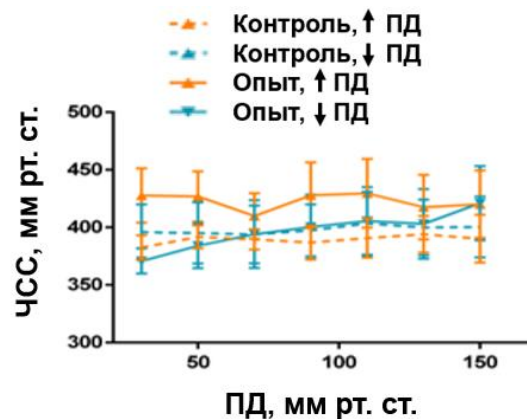
Эксперимент был выполнен на крысах в условиях возможности повышения и снижения скорости кровотока (перфузионного давления, ПД) в задней четверти туловища. Осуществляли ступенчатое повышение и затем снижение ПД в пределах 30 – 150 мм рт. ст (контроль), после чего в бедренную артерию вводили наночастицы магнетита (МНЧ1), (2 мг/мл, 2 мл в течение 2 минут) и повторяли повышение и снижение ПД в указанных пределах (опыт).

В ходе эксперимента систолическое артериальное давление (САД) и частота сердечных сокращений (ЧСС) на фоне введения МНЧ оставались на уровне исходных значений (*рисунок 27 А,Б*), ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует об отсутствии нарушений центральной гемодинамики в условиях воздействия наночастиц.

А.



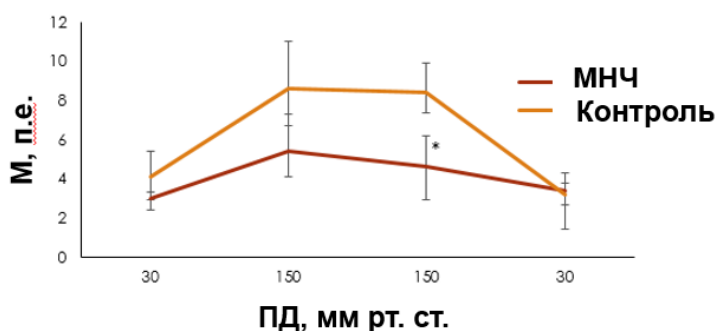
Б.



**Рисунок 27 - Динамика параметров гемодинамики у крыс в условиях повышения и снижения перфузионного давления в сосудистом регионе задней четверти туловища**

*Примечание:* А. систолическое артериальное давление, САД; Б. частота сердечных сокращения, ЧСС.

До введения МНЧ крысам при увеличении ПД отмечалось повышение уровня микроциркуляции (М), тогда как на фоне введения МНЧ отмечалась тенденция к меньшему нарастанию уровня М по сравнению с контрольными значениями (рисунок 28).



**Рисунок 28 - Динамика уровня микроциркуляции у крыс в условиях увеличения и снижения в перфузионного давления**

*Примечание:* М – уровень микроциркуляции. МНЧ – наночастицы магнетита. \* $P < 0,05$  по сравнению с контрольными значениями.



При дальнейшем снижении ПД (до 30 мм рт. ст) в исследуемых группах наблюдалось достоверное снижение уровня М. На момент окончания эксперимента уровень М в исследуемых группах был близок по значению ( $p > 0,05$ ). Уровень флакса и коэффициент вариации в ходе изменения ПД в экспериментальных группах значимо не изменялись (таблица 17) и на момент окончания эксперимента данные показатели на фоне введения МНЧ не отличались от контрольных значений ( $p > 0,05$ ), что косвенно свидетельствует о сохранности (или постепенном восстановлении) в условиях влияния МНЧ механизмов регуляции тканевого кровотока.

**Таблица 17 - Флакс ( $\sigma$ ) и коэффициент вариации ( $K_v$ ) при изменяющейся скорости кровотока**

Пробы	ПД, мм рт.ст.	МНЧ1	
		$\sigma$ , п.е.	$K_v$ , %
Повышение ПД			
Контрольные	30	0,7 [0,5; 1,0]	19,3 [9,1; 24,8]
	150	0,8 [0,6; 1,1]	11,6 [7,2; 18,3]
Опытные	30	0,8 [0,6; 1,1]	27,0 [13,; 33,6]
	150	0,7 [0,5; 1,0]	15,1 [14,0; 19,2]
Понижение ПД			
Контрольные	150	0,9 [0,5; 1,3]	9,2 [5,3; 19,2]
	30	0,7 [0,7; 1,0]	24,8 [18,3; 39,9]
Опытные	150	0,6 [0,5; 0,7]	12,6 [9,8; 18,6]
	30	0,7 [0,6; 0,8]	20,4 [18,0; 23,7]

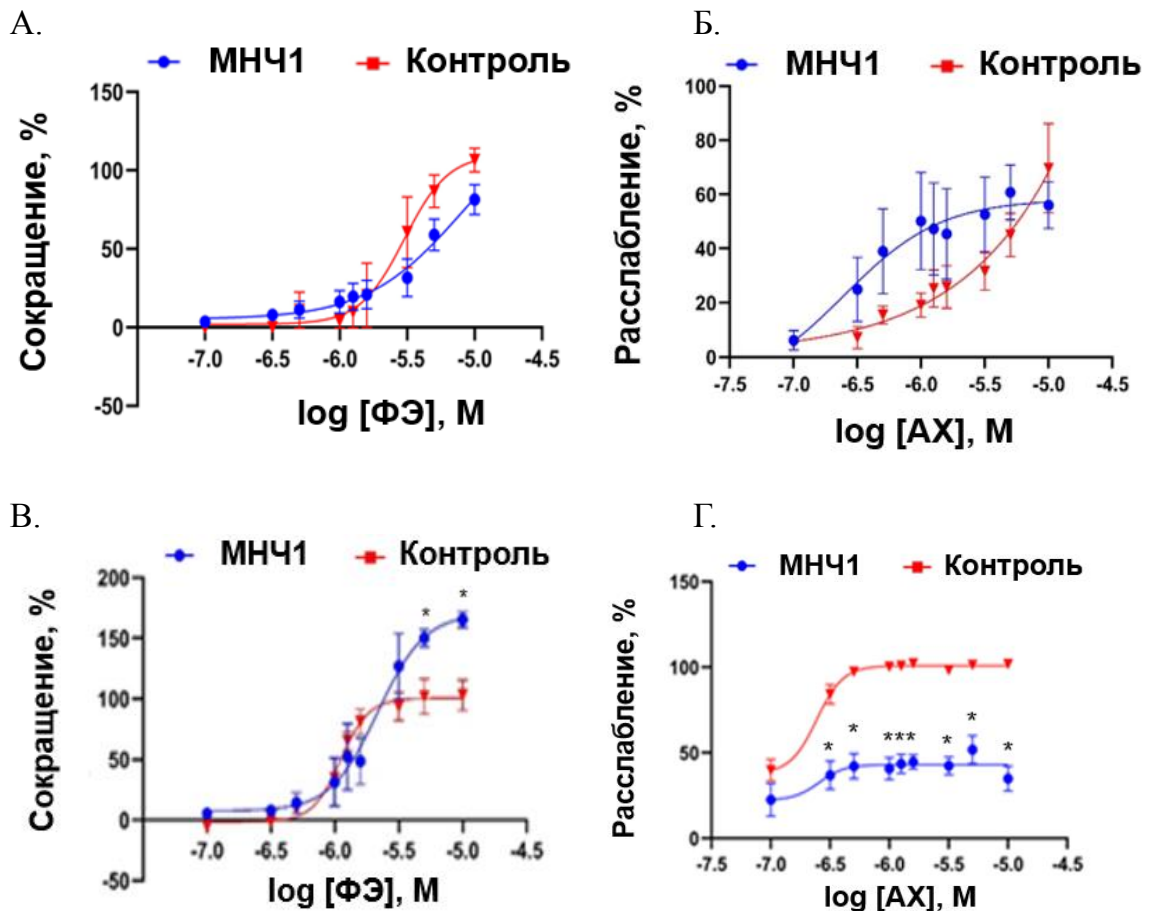
*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; ПД – перфузионное давление.

### **3.5.1 - Вазомоторные реакции сосудов после окончания эксперимента с изменением скорости кровотока**

С учетом морфологической и молекулярной гетерогенности сосудистого русла, а также существующих различий в гемодинамических условиях, характеризующих различные сосудистые бассейны, можно предполагать, что один и тот же вид наночастиц способен оказывать неодинаковое влияние в различных сосудистых регионах. В связи с этим исследовали сократительную и релаксационную функцию мезентериальных и бедренных артерий,

полученных от крыс после окончания эксперимента с изменяющейся скоростью кровотока. В качестве контроля использовали интактных животных.

Динамика сократительной активности сосудов была схожа в исследованных группах в обоих сосудистых регионах (*рисунок 29 Б,Г*) и в условиях воздействия МНЧ не имела значимых отличий от таковой у интактных животных ( $p > 0,05$ ). На фоне введения МНЧ отмечалось достоверное ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем) снижение релаксационной функции и усиление способности к сокращению сосудов брыжейки (*рисунок 29 В,Г*).



**Рисунок 29 - Кумулятивная кривая «концентрация-ответ»**

*Примечание:* А, Б. бедренные артерии; В, Г. сосуды брыжейки. МНЧ1 – наночастицы магнетита. \*  $P < 0,05$  по сравнению с контрольными значениями.

Концентрации фенилэфрина (ФЭ) и ацетилхолина (АХ), обеспечивающие максимальную величину ответа (E<sub>max</sub>) сосудов брыжейки достоверно превышали таковую для сосудов интактных животных (таблица 18).

**Таблица 18 - Значения логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа LogEC<sub>50</sub> и максимальной величины ответа E<sub>max</sub> для сосудов различных регионов крыс**

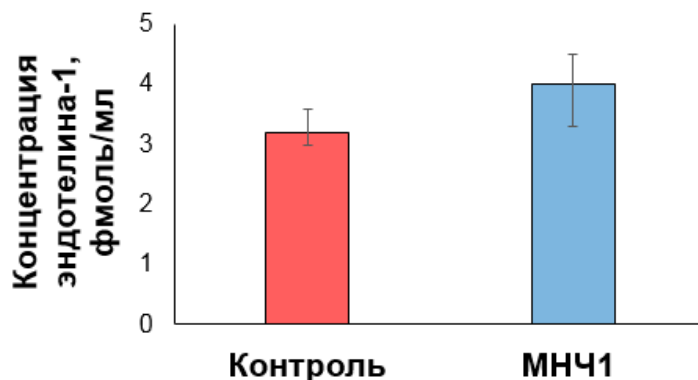
Агонист	Показатель	МНЧ1	Контроль
Бедренные артерии			
ФЭ	Log EC <sub>50</sub> , М	-5,09 ± 0,71	-5,52 ± 0,09
	E <sub>max</sub> , %	81,34 ± 9,54	106,57 ± 7,54
АХ	Log EC <sub>50</sub> , М	-6,60 ± 1,11	-5,36 ± 0,07
	E <sub>max</sub> , %	60,76 ± 10,15	77,22 ± 13,88
Артерии брыжейки			
ФЭ	Log EC <sub>50</sub> , М	-5,66 ± 0,80	-5,96 ± 0,03
	E <sub>max</sub> , %	165,33 ± 6,51 **	102,92 ± 12,65
АХ	Log EC <sub>50</sub> , М	-6,59 ± 0,44	-6,61 ± 0,08
	E <sub>max</sub> , %	51,85 ± 8,28*	102,24 ± 0,72

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита. ФЭ – фенилэфрин; ФХ-ацетилхолин. \* P < 0,05 по сравнению с контролем.

В плазме крови, полученной от животных после окончания эксперимента с изменяющейся скоростью кровотока, определяли уровни эндотелина-1 и оксида азота (NO), играющих значимую роль в гомеостазе сосудов.

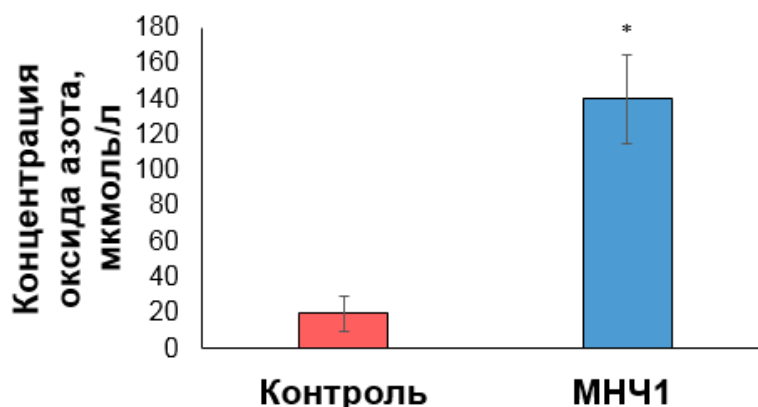
Уровень эндотелина-1 в группе животных с введением МНЧ не претерпел значительных изменений в сравнении с таковым у интактных животных (рисунк 30).

При этом уровень NO оказался достоверно выше относительно группы контроля (рисунк 31).



**Рисунок 30 - Плазменные уровни эндотелина-1 у крыс после эксперимента с изменяющейся скоростью кровотока**

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита.



**Рисунок 31 - Плазменные уровни оксида азота у крыс после эксперимента с изменяющейся скоростью кровотока**

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита. \*  $P < 0,05$  по сравнению с контрольными значениями.

Полученные данные свидетельствуют о сохранности регуляторной функции эндотелия, эффекты которой направлены на активизацию механизмов вазорелаксации в условиях воздействия МНЧ.

Отсутствие в группе МНЧ изменений сократительной и релаксационной функции бедренных артерий, подверженных прямому воздействию в виде изменений скорости кровотока, с одной стороны может отражать сохранность механизмов активации вазомоторных механизмов в условиях влияния наночастиц. С другой стороны, артериолы брыжейки, не подверженные прямым изменениям скорости кровотока, претерпевали в условиях

воздействия МНЧ изменения функциональной активности в виде снижения релаксационной функции, что может отражать влияние наночастиц на механизмы вазорелаксации, реализующееся на уровне резистивных сосудов.

Таким образом, в условиях изменяющейся скорости кровотока сосудистые эффекты внутривенного введения наночастиц отличаются в различных сосудистых регионах, при этом наблюдаемое снижение релаксационной и повышение сократительной активности сосудов брыжейки в условиях воздействия наночастиц магнетита не вызывают нарушений на уровне центральной гемодинамики и механизмов регуляции тканевого кровотока.

### **3.6 - Органное распределение немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава при их внутривенном введении крысам**

Способность МНЧ накапливаться в отдельных органах, с одной стороны, можно рассматривать как преимущество для направленного транспорта лекарств. С другой стороны, нахождение наночастиц в органах может вызывать развитие воспаления и фиброз, а также способствовать формированию системных токсических эффектов наночастиц. Для формирования представления о возможных органах-мишенях для наночастиц необходимо исследовать закономерности их биораспределения в организме при конкретном способе введения. Поскольку на динамику органного распределения наночастиц могут оказывать влияние их физико-химические свойства - размер, форма, способность к агрегации и т.д. [162], а также характеристики поверхности — наличие или отсутствие оболочки и ее качественный состав [47], можно предполагать различную динамику распределения в организме наночастиц магнетита (МНЧ1) и композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2), отличающимися

вышеуказанными характеристиками. В связи с этим, была исследована динамика распределения МНЧ при их внутривенном введении крысам в печени, сердце, почках, селезенке, головном мозге и легких как в основных барьерных органах и предполагаемых органах-мишенях.

Эксперимент проводили на крысах, которым осуществляли однократное внутривенное введение 1,4 мг МНЧ1 или МНЧ2 в объеме 2 мл, после чего через 1, 3, 6 и 24 часа после введения осуществляли эвтаназию животных и взятие органов.

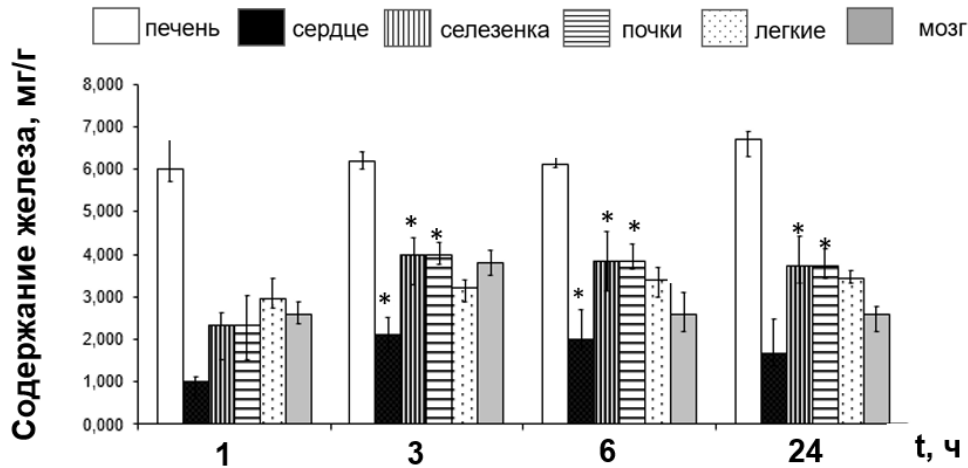
При внутривенном введении МНЧ1 и МНЧ2 максимальное накопление наночастиц на всех этапах эксперимента наблюдалось в печени (*рисунок 32, рисунок 33*), что, вероятно, обусловлено наличием разветвленной сосудистой сети в печени, что, вероятно, обусловлено наличием разветвленной сосудистой сети в печени и высокой фагоцитарной активностью клеток Купфера, а не тропностью МНЧ к данному органу.

Также внутривенное введение МНЧ1 и МНЧ2 характеризовалось интенсивным накоплением железа в селезенке и почках. Можно предполагать, что в селезенке это связано со способностью данного органа к аккумуляции крови с находящимися в ней наночастицами. Накопление МНЧ в почках может быть связано с захватом МНЧ эпителиоцитами и интерстициальными макрофагами органа [340]. Однако, с учетом относительно слабой развитости в почках системы мононуклеарных фагоцитов [10] можно предположить и тропность наночастиц к данному органу. МНЧ1 и МНЧ2 накапливаются также в головном мозге крыс, что может подтверждать мнение ряда авторов о способности проникновения наночастиц металлов через гематоэнцефалический барьер [107, 245]. Однако накопление в мозге можно также объяснить высоким уровнем его кровоснабжения. Обращает на себя внимание факт постепенного увеличения уровня железа в сердце при внутривенном введении МНЧ2, что может являться косвенным свидетельством тропности данного вида наночастиц к миокарду.

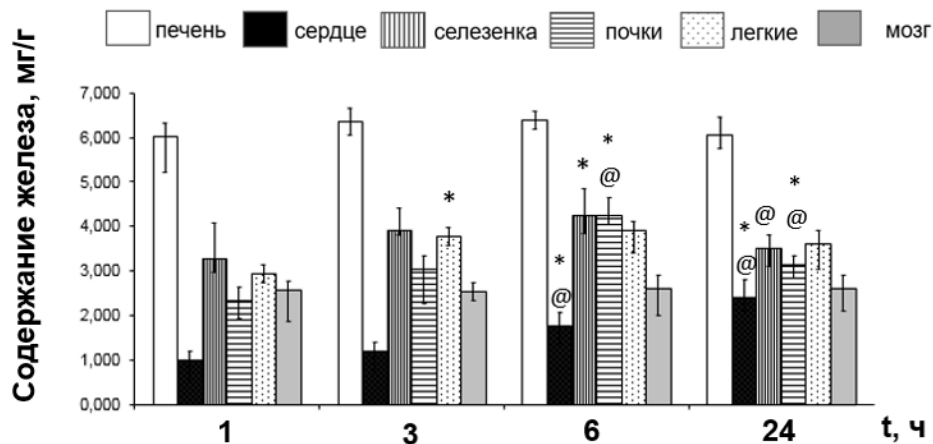
На фоне введения МНЧ1 и МНЧ2 содержание суммарного экзогенного

железа в органах крыс к окончанию эксперимента (через 24 часа после внутривенного введения) снижалось в два раза.

А.



Б.



**Рисунок 32 - Динамика органного распределения наночастиц при их внутривенном введении крысам**

*Примечание:* А. МНЧ1; Б. МНЧ2. \*  $P < 0,05$  по сравнению с этапом эксперимента, соответствующем 1 часу после введения МНЧ; @  $P < 0,05$  по сравнению предыдущим этапом эксперимента.

Вероятно, на динамику органного распределения оказывает влияние целый ряд факторов, определяемых условиями синтеза наночастиц — характеристика поверхности, наличие/отсутствие оболочки и ее качественный

состав, размер наночастиц, их форма, способность к аггломерации и т.д. [162]. Так, установлено влияние на этот процесс характеристик поверхности наночастиц — наличие или отсутствие оболочки и ее качественный состав [87, 162].

### **3.7 - Системные эффекты однократного и многократного внутривенного введения крысам немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа различного состава**

При исследовании возможности использования наночастиц в качестве средства адресной доставки лекарств, необходимо оценить возможные варианты режимов их введения, которые могут подразумевать как болюсное, так и многократное введение. Исследование системных эффектов однократного и многократного применения наночастиц позволит составить представление о возможных побочных эффектах использования систем адресной доставки лекарств. При этом, с учетом возможного постепенного проявления токсических эффектов МНЧ, обусловленных их накоплением в органах и/или их постепенной биотрансформацией, необходимо исследовать отсроченные эффекты их введения. В связи с этим, были исследованы системные эффекты одно- и многократного введения МНЧ крысам.

Для исследования системных эффектов однократного внутривенного введения самцам и самкам крыс наночастиц использовали МНЧ1 и МНЧ2 в дозе 400,0 мг/кг, подобранной эмпирическим путем в пилотном эксперименте как предельная доза МНЧ1, не вызывающая гибели самцов крыс в течение первых суток после введения. Введение данной дозы происходило в течение 5 часов с интервалом 1 час, что приравнивается к однократному введению [16].

После однократного внутривенного введения МНЧ1 в дозе 400,0 мг/кг погибло 1 животное (самка) из 16, исходно включенных в исследование (*таблица 19*). Животное погибло в течение первых суток после введения.



После однократного внутривенного введения аналогичной дозы МНЧ2 в течение первых суток после введения погибло 4 животных из 16 (2 самки и 2 самца).

**Таблица 19 - Сводные данные смертности крыс после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

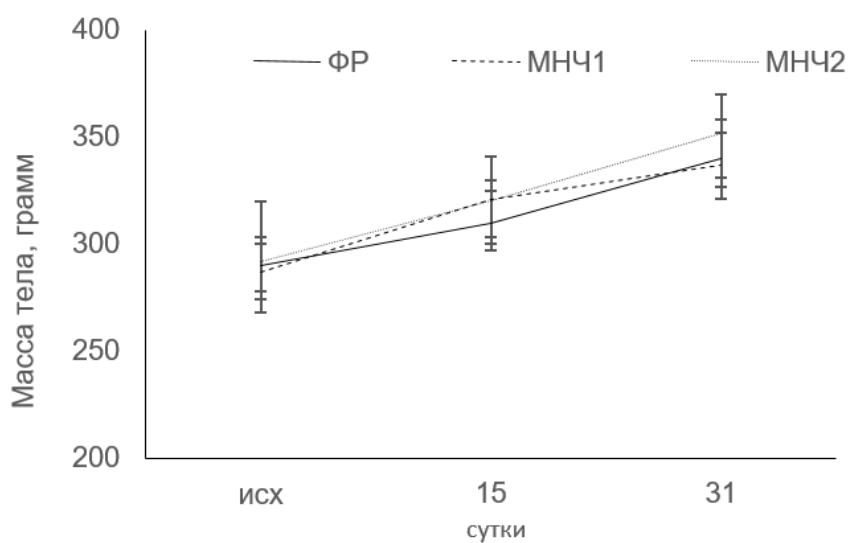
Доза, мг/кг	Исходное количество животных		Количество погибших животных	
	самцы	самки	самцы	самки
МНЧ1				
400,0	8	8	0	1
МНЧ2				
400,0	8	8	2	2

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния.

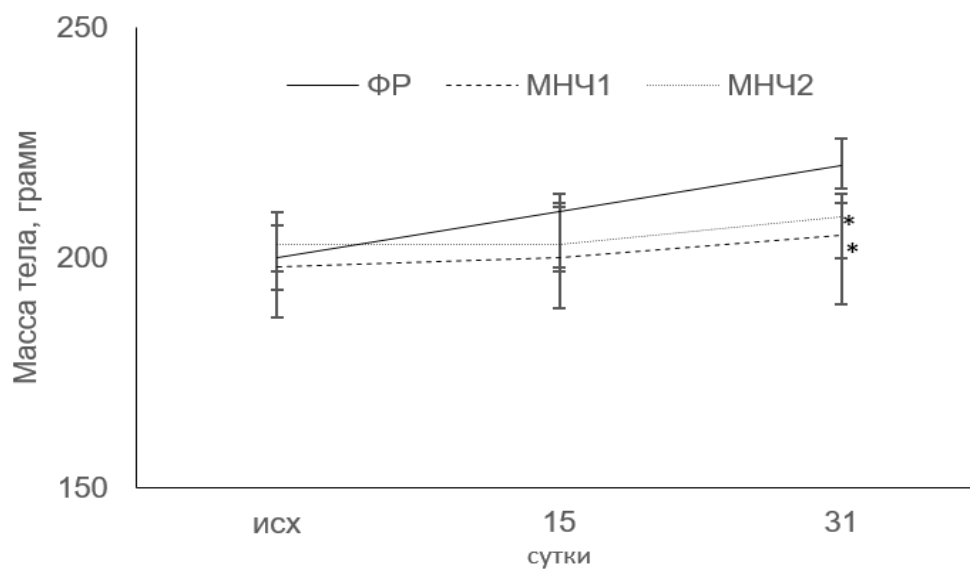
У самцов и самок контрольной группы в ходе эксперимента наблюдалось увеличение массы тела в пределах физиологической (и внутрилабораторной) нормы [26]. После введения МНЧ1 и МНЧ2 самцам крыс отмечался прирост массы тела (*рисунок 32 А,Б*), соответствующий таковому в контрольной группе,  $p > 0,05$ . В группах с введением самкам МНЧ1 и МНЧ2 к 31-м суткам после введения отмечалось приостановление нарастания массы тела ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем).

На протяжении всего исследования во всех группах (самцы и самки) наблюдалось постепенное равнозначное увеличение потребления животными корма (*рисунок 34 А,Б*). Потребление воды при этом оставалось на уровне исходных значений (*рисунок 35 А,Б*).

А.



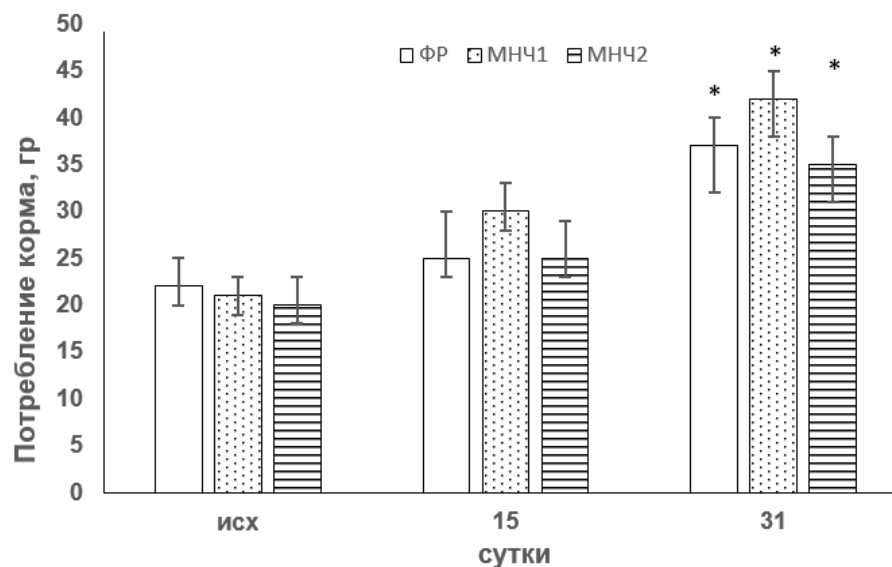
Б.



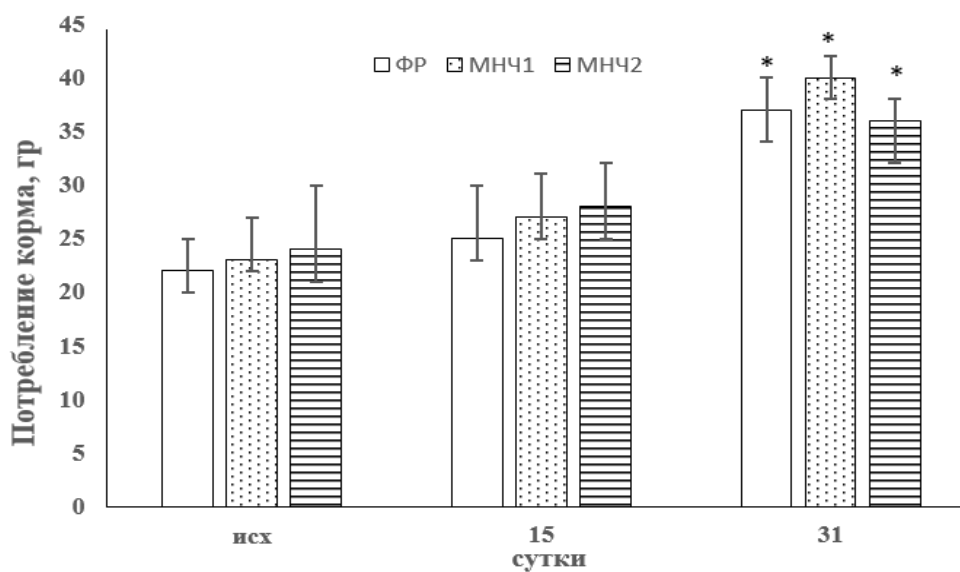
**Рисунок 33 - Динамика массы тела экспериментальных животных после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Самцы; Б. Самки. \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем.

А.



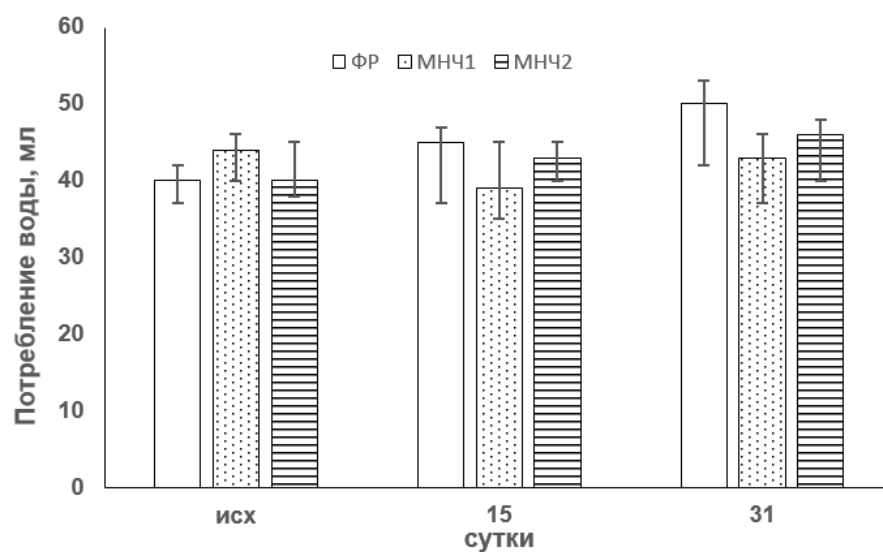
Б.



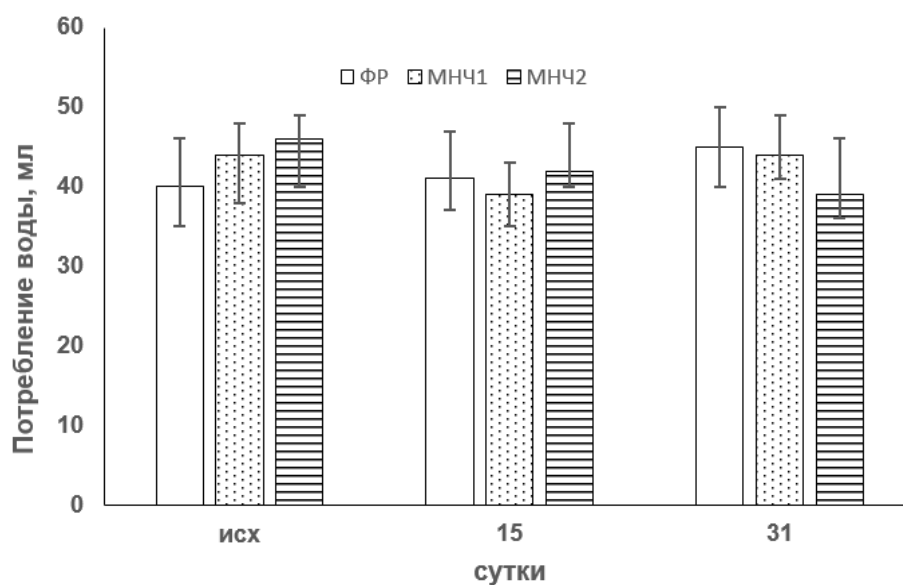
**Рисунок 34 - Динамика изменения потребления корма после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Самцы; Б. Самки. \* $P < 0,05$  по сравнению с исходными значениями.

А.



Б.

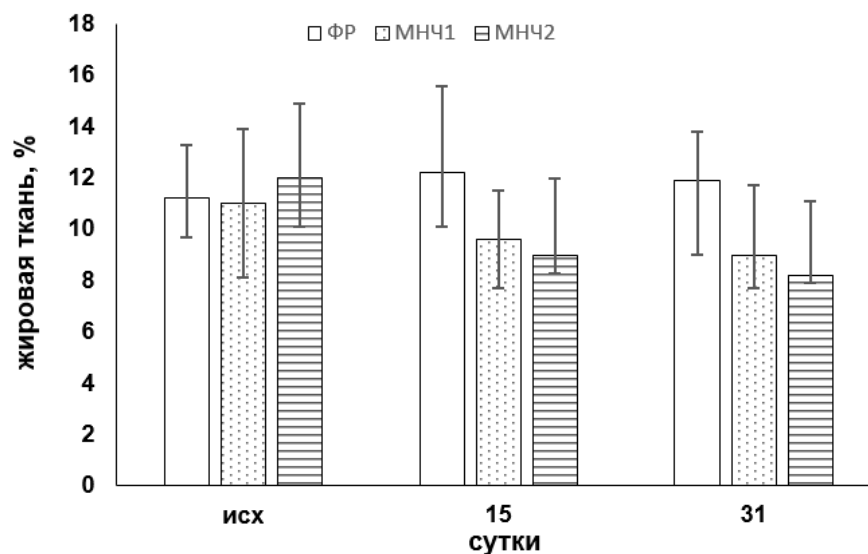


**Рисунок 35 - Динамика изменения потребления воды после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

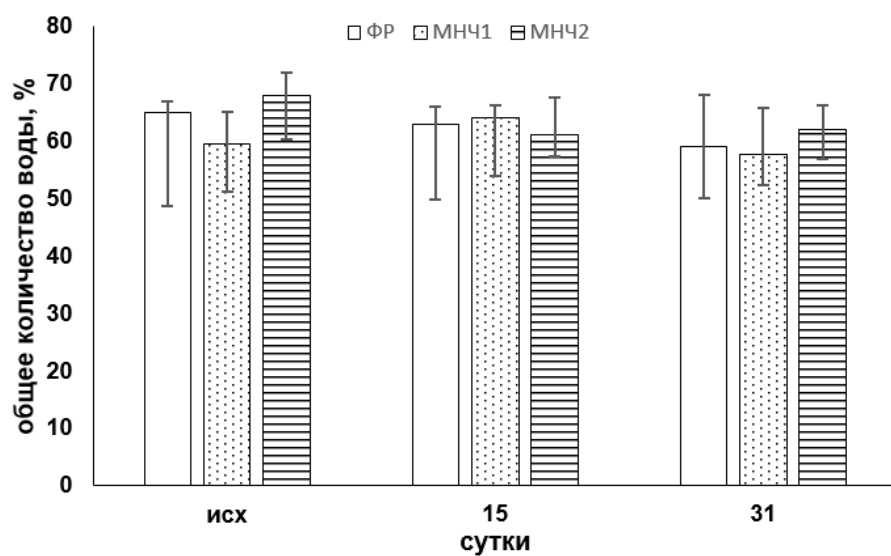
*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Самцы; Б. Самки.

В динамике эксперимента у самцов и самок крыс с введением МНЧ1 и МНЧ2 наблюдались сходные изменения компонентного состава тела (*рисунок 36 А,Б и рисунок 37 А,Б*).

А.



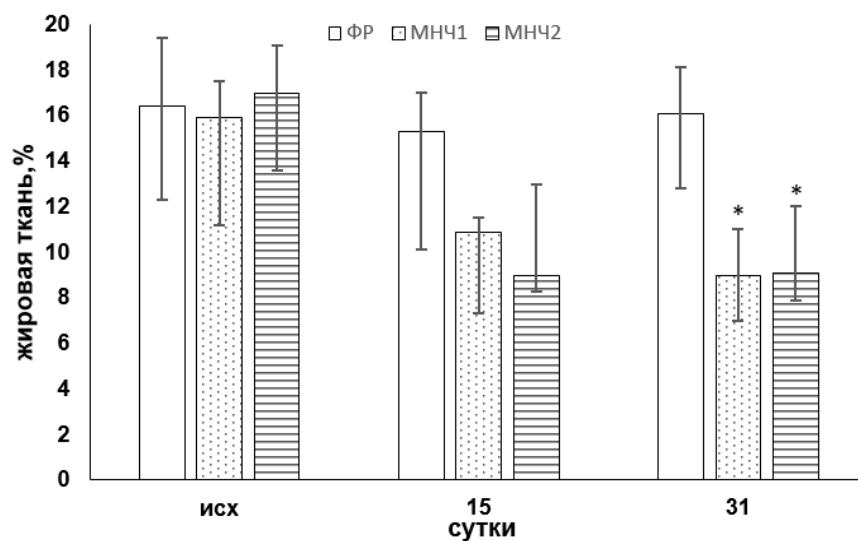
Б.



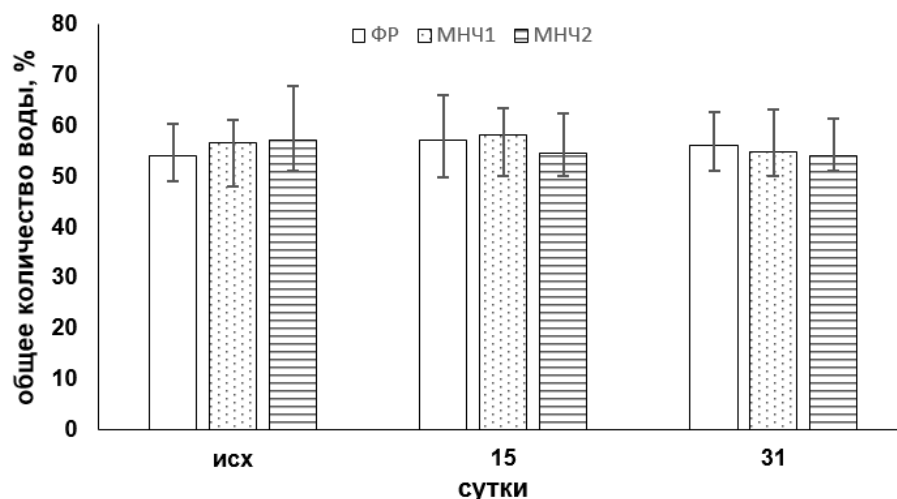
**Рисунок 36 - Компонентный состав тела самцов крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Примечание: ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Жировая ткань; Б. Общее количество воды.

А.



Б.



**Рисунок 37 - Компонентный состав тела самок крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастиц магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Жировая ткань; Б. Общее количество воды.

Так, наблюдалось снижение процента жировой ткани на фоне неизменного процентного содержания активной клеточной массы. При этом у самцов данное снижение выражалось в виде тенденции (31-е сутки), в то время как у самок к окончанию эксперимента наблюдалось достоверное снижение %

жировой ткани по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что общее количество воды в организме самцов и самок крыс всех исследуемых групп в ходе эксперимента оставалось на постоянном уровне, соответствующем исходному, что являлось свидетельством отсутствия нарушений водного баланса.

У самцов крыс группы МНЧ1 в моче обнаруживался белок, лейкоциты (*таблица 20*), что являлось косвенным свидетельством воспалительной реакции. Повышенное содержание билирубина в моче у самцов крыс с введением МНЧ2 могло быть спровоцировано разрушением эритроцитов вследствие возможного токсического действия МНЧ2 на клетки крови. Также у животных данной группы наблюдалось снижение удельного веса мочи и наличие белка, что может быть связано с токсическим влиянием МНЧ2 в отношении почек.

**Таблица 20 - Показатели мочи крыс (самцы и самки) после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц различного состава**

Показатели	Группы					
	МНЧ1		МНЧ2		ФР	
	Самцы n=8	Самки n=7	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=5	Самки n=5
Билирубин, мг/дл есть (+), нет (-)	-	-	+ - у 50% (3 животных)	-	-	-
Уробилиноген, мг/дл есть (+), нет (-)	-	-	-	-	-	-
Кетоновые тела, мг/дл есть (+), нет (-)	+ - у 12% (1 животное)	-	+ - у 50% (3 животных)	-	-	-
Глюкоза, мг/дл	-	-	-	-	-	-
Белок, мг/дл	4,3[3,9; 4,0] - у 50% (4 животных)	-	5,1[4,8;5,9]* - у 50% (3 животных)	-	-	-
Кровь, эр/мкл	-	-	-	-	-	-
рН	7,0[6,8;7,4]	7,2[6,5;7,8]	6,9[6,5;7,5]	7,2[6,3;7,6]	7,2 [7,0;7,4]	7,3[7,0;7,5]
Лейкоциты	2,5 [1,0; 4,0] - у 50% (4 животных)	-	-	-	-	-
Удельный вес, г/мл	1,030 [1,029;1,030]	1,025[1,023;1,026]	1,010[1,009;1,012] <sup>#</sup>	1,024[1,023;1,026]	1,029 [1,029;1,030]	1,024 [1,022;1,025]

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастиц магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. \*P < 0,05 по сравнению с группой самцы МНЧ1; #P < 0,05 по сравнению со всеми экспериментальными группами.



В динамике эксперимента гематологические показатели опытных и контрольных групп не различались между собой, не обнаружено также различий между опытными группами (*таблица 21*).

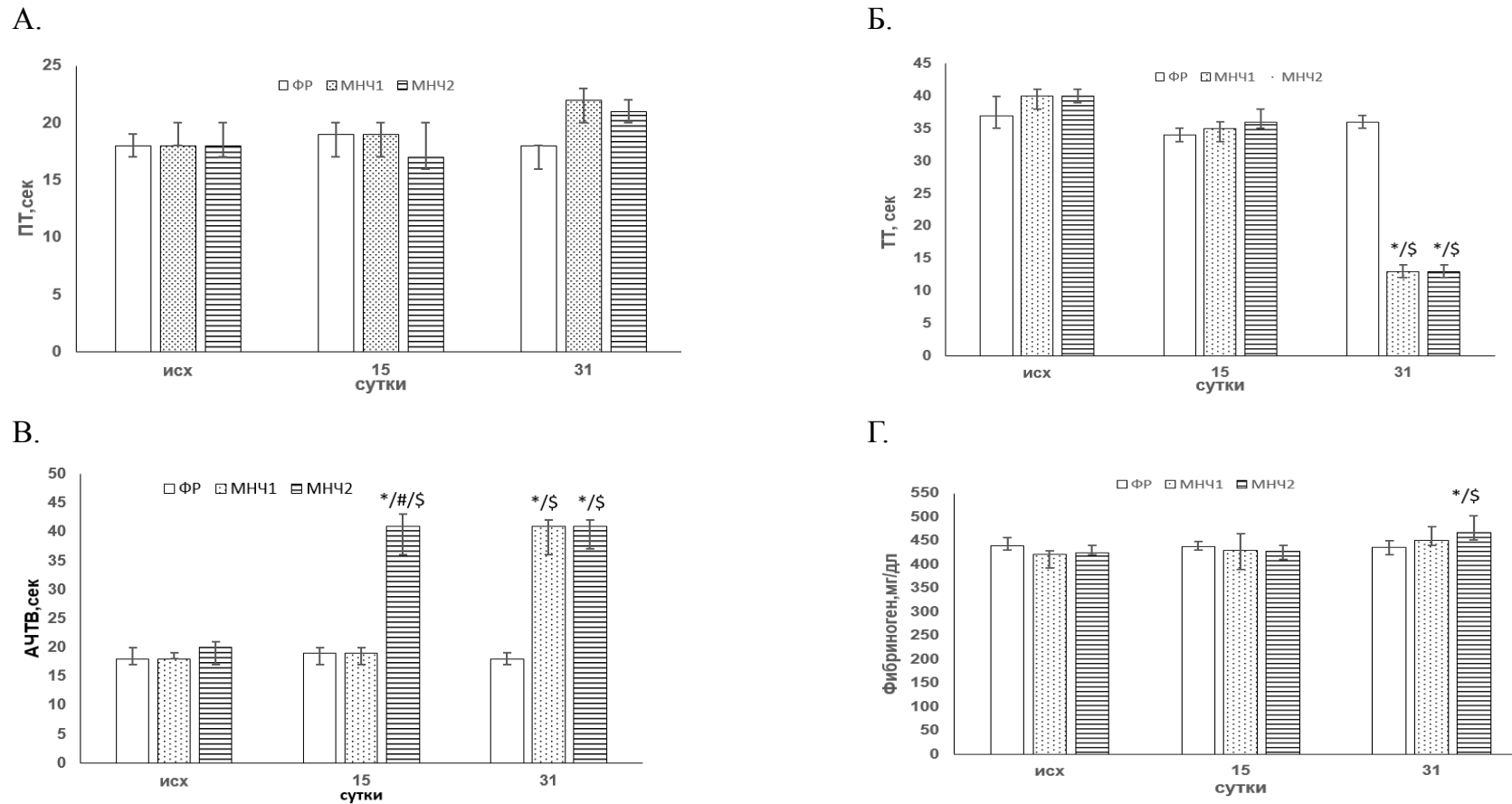
В динамике эксперимента биохимические показатели у крыс на фоне введения МНЧ1 не претерпевали изменений и не отличались от контрольных значений (*таблица 22*). На фоне введения МНЧ2 в группе самцов наблюдалось повышение уровней аспаратаминотрансферазы (АСТ), ( $p < 0,05$  по сравнению с исходными значениями) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем), что может отражать гепатотоксический эффект данного вида МНЧ.

При попадании наночастиц в кровотоки они могут взаимодействовать с ключевыми компонентами системы свертывания (тромбоциты, факторы свертывания) и оказывать про- и антикоагулянтные эффекты [82, 153, 234]. Также нарушения коагуляции могут быть обусловлены изменениями как количественных характеристик эритроцитов (количество эритроцитов, гематокрит), так и качественных (деформируемость, агрегация и т.д.) в условиях воздействия наночастиц. В связи с этим в ходе 31-дневного эксперимента изучали параметры гемостаза у крыс после однократного внутривенного введения МНЧ.

Количество тромбоцитов в крови крыс всех исследуемых групп не различалось. Показатели системы гемостаза самцов и самок животных на фоне однократного внутривенного введения МНЧ отражены на рисунках 38 и 39 (А-Г), соответственно. На 31-е сутки после введения всех видов наночастиц у животных обоего пола отмечалось снижение показателя тромбинового времени ( $p < 0,05$  по сравнению с исходными значениями). Увеличение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) в группах самцов и самок с введением композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2) наблюдалось к 15-м суткам после введения МНЧ, ( $p < 0,05$  по сравнению с исходными значениями и значениями в группе с введением наночастиц магнетита, МНЧ1), тогда как на момент окончания эксперимента

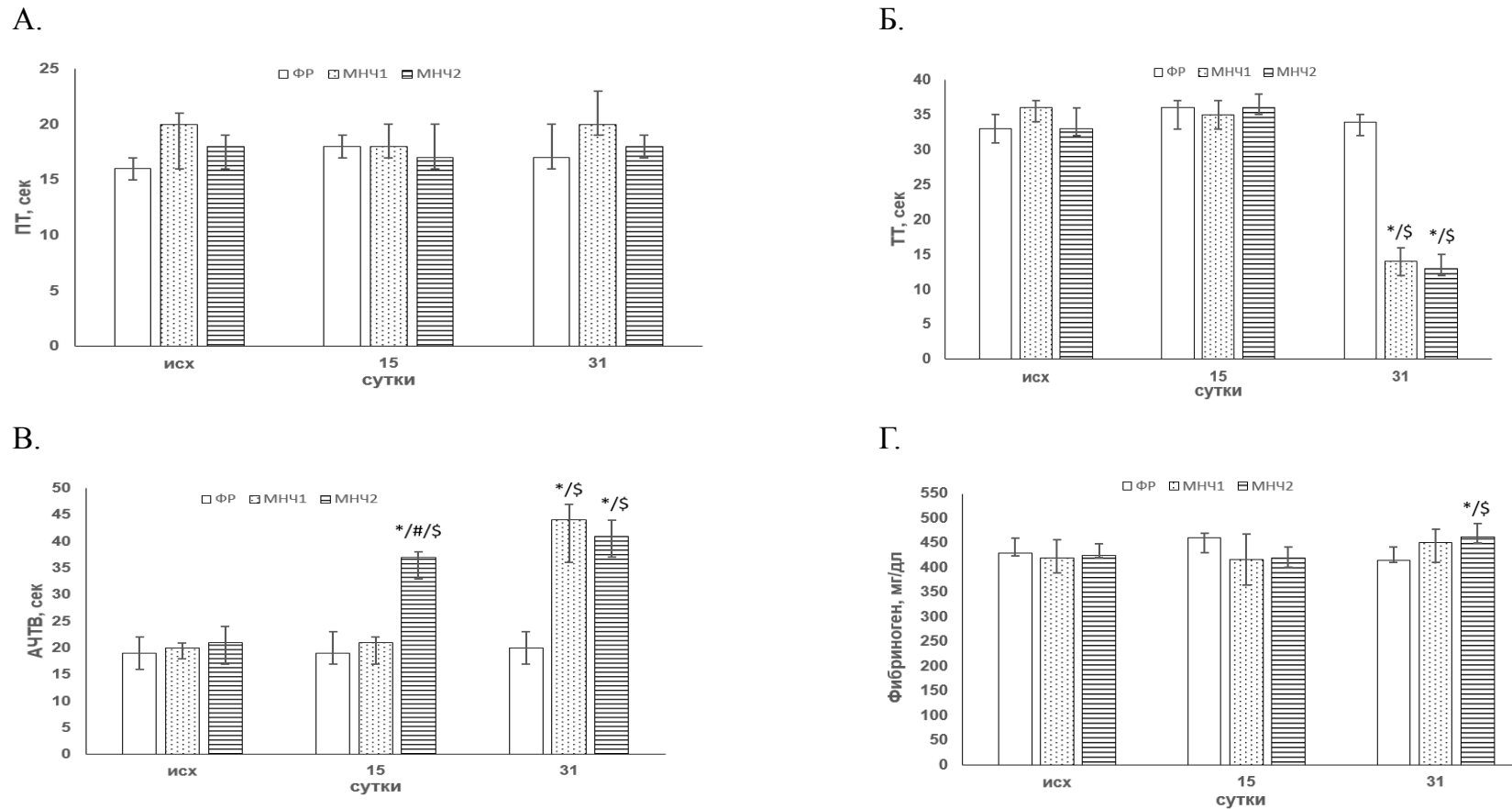
(31-е сутки) в группах с введением обоих видов наночастиц (МНЧ1 и МНЧ2) данный показатель оказался достоверно выше как исходных, так и контрольных значений ( $p < 0,05$ ). В условиях однократного введения самцам и самкам крыс МНЧ2 концентрация фибриногена к окончанию эксперимента (31-е сутки) была достоверно ( $p < 0,05$ ) выше таковой в группах контроля и МНЧ1, а также исходного уровня.

Отсутствие изменений у самцов и самок крыс со стороны протромбинового времени (ПТ) в условиях однократного воздействия МНЧ1 и МНЧ2 может являться свидетельством неизменной активности витамин К-зависимых факторов (II, VII, X). Удлинение АЧТВ, зависящего от количества плазменных факторов крови (XII, XI, IX, VIII, высокомолекулярного кининогена, прекалликреина), на фоне воздействия МНЧ может являться следствием дефицита данных факторов, обуславливающего в конечном счете снижение коагуляционного потенциала. Можно предполагать, что вероятный дефицит плазменных факторов обусловлен гепатотоксическим действием наночастиц (которое более выражено у МНЧ2). Снижение у самок и самцов крыс тромбинового времени (ТТ) также свидетельствует о гипокоагуляционных сдвигах, обусловленных дисбалансом анти- и прокоагулянтов, реализующих конечный этап свертывания крови и/или токсическим поражением печени в условиях воздействия МНЧ2



**Рисунок 38 - Плазменные показатели гемостаза крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастиц магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Протромбиновое время; Б. Тромбиновое время; В. Активированное частичное тромбопластиновое время; Г. Концентрация фибриногена. \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем; # $P < 0,05$  по сравнению с МНЧ1 на данном этапе эксперимента; \$ $P < 0,05$  по сравнению с исходным значением.



**Рисунок 39 - Плазменные показатели гемостаза крови самок крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастиц магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Протромбиновое время; Б. Тромбиновое время; В. Активированное частичное тромбопластиновое время; Г. Концентрация фибриногена. \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем; # $P < 0,05$  по сравнению с МНЧ1 на данном этапе эксперимента; \$ $P < 0,05$  по сравнению с исходным значением

**Таблица 21 - Гематологические показатели крыс (самцы и самки) на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Дни	Группа					
	ФР		МНЧ1		МНЧ2	
	Самцы n=5	Самки n=5	Самцы n=8	Самки n=7	Самцы n=6	Самки n=6
Лейкоциты, WBC, г/л						
исх	6,1[4,8;9,8]	4,5[2,6;5,3]	4,5[4,0;6,1]	4,7[3,5;6,5]	4,8[4,8;4,81]	2,7[2,6;2,7]
15	6,4[5,4;10,3]	4,8[3,4;5,1]	8,3[5,3;11,1]	5,2[4;6,5]	4,67[4,6;4,8]	3,5[3,4;3,48]
31	7,1 [6,2;10,0]	5,0[4,7; 7,1]	10,7[9,1;12,2]	4,4[3,6;5,4]	5,1[5,1;5,2]	5,0[4,9;5,1]
Гранулоциты, Gr%						
исх	14,7[14,0;18,7]	20,1[17,6;20,1]	13,0[9,8;16,1]	14,0[13;15,3]	15,3[14,9;15,6]	22,5[21,8;23,3]
15	21,3[16,6;22,1]	17,1[15,3;19,0]	26,1[25;28,6]	26,5[22,8;30,4]	28,3[27,4;29,2]	16,9[15,7;18,1]
31	18,7[16,9;21,1]	18,3[15,7;20,5]	31,9[25,8;35,4]	15,8[14,0;20,3]	20,7[20,2;21,2]	11,2[10,9;11,5]
Моноциты, Мi%						
исх	4,0[3,7;8,3]	8,1[5,9;10,4]	7,6[5,9;8,2]	4,5[4,0;5,7]	8,7[8,3;9,2]	10,8[10,4;11,3]
15	8,4[8,0;9,1]	4,0[3,8;8,6]	8,4[5,1;11,8]	5,8[4,8;7,6]	10,7[10,1;11,4]	3,5[3,2;3,9]
31	7,6[5,1;10,1]	3,6[3,2;6,7]	8,5[7,7;9,8]	7,9[6,3;9]	11,0[10,2;12]	3,1[2,8;3,4]
Лимфоциты, Lym%						
исх	79,1[74,3;80,4]	66,4[63,9;71,5]	79,5[76,5;83,4]	80,2[79,2;81,5]	74,4[73,6;75,1]	66,4[66;66,8]
15	71,5[62,1;75,9]	74,6[67,8;82,7]	59,5[58,3;63,7]	66,1[59,1;71,1]	61,8[59,8;63,7]	83,8[83,2;84,4]
31	70,5[69,7;76,1]	74,8[67,5;84,5]	66,3[60,9;71,1]	79,6[74,6;80,4]	69,3[68,3;70,3]	87,5[86,6;88,3]
Эритроциты, RBC, 10 <sup>12</sup> /л						
исх	7,0[6,4;8,3]	6,9[6,1;8,7]	7,4[6,6;7,5]	7,0[6,5;7,4]	7,5[7,4;7,7]	6,9[6,8;7]
15	7,0[6,4;8,1]	7,3[7,0;8,4]	8,0[7,2;8,2]	7,4[7,3;7,5]	7,7[7,7;7,8]	7,6[7,4;7,7]
31	6,7[6,3;8,5]	7,6 [7,1;8,0]	7,2[6,6;7,8]	7,2[7,1;7,3]	7,7[7,7;7,8]	7,1[7,0;7,2]
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCH,pg						
исх	19,5[19,0;20,0]	18,9[18,0;20,0]	19,8[19,3;20,1]	19,4[19,2;19,7]	19,5[19,3;19,6]	20,2[20,1;20,4]
15	19,7 [18,2;20,3]	18,8[18,1;20,2]	17,8[17,3;18,4]	19,3[19;19,8]	18,9[18,7;19,8]	20,1[19,6;20,5]
31	20,1[19,5;21,5]	19,0[18,2;20,4]	19,6[19,1;19,9]	20,3[20,1;20,4]	18,5[18,2;18,9]	20,2[19,8;20,5]
Средний объем эритроцита, MCV,fl						
исх	60,7[57,9;62,5]	59,1[58,6;61,5]	61,0[59,5;62,3]	62,3[61,8;62,6]	57,5[57,3;57,8]	62,0[61,5;62,5]
15	61,5[61,0;62,8]	58,4[56,5;62,9]	59[58,5;59,3]	62,5[61,5;63,3]	60,5[60,3;60,8]	62,5[62,3;62,8]

31	59,4[56,5;61,0]	60,5[59,3;63,1]	57,5[56;58,3]	61,0[60,0;61,3]	57,0[56,5;57,5]	60,0[60,0;60,0]
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, МСНС, г/л						
исх	322,0[317,5;330,5]	317,0[294,9;334,1]	324,0[321,3;325,8]	314,3[312,5;316,6]	331,5[330,3;332,8]	321,0[319,5;322,5]
15	317,0 [313,0;321,7]	317,0[308,5;323,9]	301,0[296,8;308,8]	311,0[306,5;316,8]	309,5[306,8;312,3]	304,5[303,3;305,8]
31	327,3[321,4;335,5]	319,4[318,5;323,9]	340,5[337;345]	335,5[331,0;342,0]	318,5[316,8;320,3]	320,0[319,0;321,0]
Гемоглобин, Hb, г/л						
исх	140,3[133,5;150,1]	137,0[139,5;152,0]	142,0[125,3;147,0]	135,5[126,8;142,0]	148,5[147,3;149,8]	130,5[129,3;131,8]
15	140,8[135,9;147,7]	137,0[132,7;151,3]	137,5[120;145,8]	142,5[142;144,3]	140,5[139,8;141,3]	134,0[132,0;136,0]
31	143,8[137,4;147,5]	140,2[133,9;144,2]	149,5[144,3;150,3]	146,0[143,3;148,6]	137,0[136,5;137,5]	131,4[129,6;133,2]
Гематокрит, HCT, %						
исх	43,1[42,0;46,4]	45,4[43,1;47,4]	44,5[39,32;45,6]	43,3[40,2;45,5]	43,4[42,4;44,3]	42,8[41,9;43,7]
15	44,2[42,6;48,6]	45,8[42,9;47,6]	46,3[40,1;48,2]	46,1[46,0;46,2]	45,0[44,3;45,8]	45,5[45,2;45,7]
31	44,0[41,2;47,9]	44,8[42,6;47,7]	44,2[42,2;45,7]	42,7[42,3;43,2]	42,2[41,3;43,0]	43,4[42,6;44,2]
Тромбоциты, PLT, 10 <sup>12</sup> /л						
исх	500,5[467,1;540,0]	496,0[476,0;551,0]	503,0[489,0;542,1]	500,7[479,4;551,0]	480,7[476,5;549,4]	500,1[476,6;559,8]
15	497,5[454,7;531,0]	510,5[478,7;558,2]	509,5[467,2;550,1]	519,5[477,8;555,3]	503,1[479,8;535,9]	496,2[471,8;542,2]
31	510,5[488,1;534,0]	500,1[479,9;547,1]	487,1[479,9;535,9]	499,9[487,1;545,5]	509,3[470,1;551,2]	509,0[479,1;542,2]

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния.

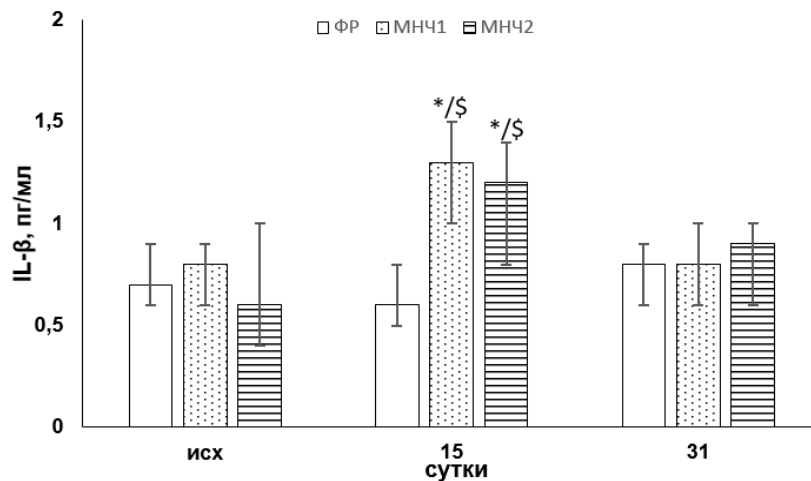
**Таблица 22 - Показатели биохимического анализа крови крыс (самцы и самки) на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Дни	Группа					
	ФР		МНЧ1		МНЧ2	
	Самцы n=5	Самки n=5	Самцы n=8	Самки n=7	Самцы n=6	Самки n=6
Аланинаминотрансфераза, АЛТ, Ед/л						
исх	63,5[56,4;67,0]	60,7[45,7;63,1]	66,5[60,4;69,0]	56,3[55,2;64,6]	65,5[60,2;68,3]	61,1[54,9;64,5]
15	76,9[65,5;83,0]	63,7[62,0;72,2]	66,9[65,5;74,1]	60,0[57,5,0;67,8]	69,3[65,1;73,5]	69,9[62,5;70,1]
31	58,5[55,4;66,2]	57,0[43,6;64,0]	70,1[63,4;72,3]	64,4[50,3;68,1]	76,3[70,0;78,9] <sup>#</sup>	65,3[63,6;76,0]
Аспаргатаминотрансфераза, АСТ, Ед/л						
исх	131,0[126,7;146,5]	110,4[104,8;131,5]	136,0[125,6;143,9]	117,2[102,8;129,3]	130,0[127,6;144,2]	120,4[114,38;135,5]
15	143,1[136,6;147,8]	123,3[115,0;138,1]	144,1[128,6;148,2]	121,5[105,0;137,2]	149,9[146,0;154,1] <sup>*</sup>	120,3[117,2;133,1]
31	140,0[126,7;149,7]	109,3[98,5;129,9]	140,5[120,4;148,5]	119,9[110,2;134,9]	148,4[144,7;156,2] <sup>*</sup>	110,9[105,5;130,0]
Билирубин общий, мг/дл						
исх	0,7[0,6;1,0]	0,5[0,5;0,9]	0,6[0,4;0,9]	0,8[0,5;1,1]	0,6[0,3;0,7]	0,5[0,4;0,7]
15	0,9[0,8;1,0]	0,6[0,4;1,0]	0,5[0,3;0,9]	0,6[0,5;1,0]	0,8[0,4;0,9]	0,6[0,5;0,7]
31	0,6[0,5;0,8]	0,9[0,6;1,1]	0,7[0,4;1,0]	0,5[0,4;0,8]	0,6[0,4;0,8]	0,8[0,7;0,9]
Общий белок, г/дл						
исх	6,8[5,4;7,4]	5,4[5,0;7,0]	6,0[6,1;7,0]	5,5[5,3;6,3]	6,0[5,6;7,2]	6,2[6,0;7,1]
15	5,9[5,6;7,9]	6,4[5,4;7,1]	6,1[5,5;7,2]	6,6[6,0;7,2]	6,1[5,3;7,0]	5,7[5,2;6,7]
31	6,1[5,2;7,0]	6,1[4,7;7,4]	5,9[5,2;6,9]	6,7[5,6;7,0]	5,6[5,4;6,2]	6,6[5,6;7,0]
Глюкоза, мг/дл						
исх	122,9[120,6;131,4]	123,3[121,1;130,4]	121,8 [120,1;129,6]	130,0[123,6;133,4]	121,8[120,0;129,8]	125,7[119,8;131,5]
15	120,9[119,6;128,2]	129,4[120,0;134,1]	125,1[119,7;134,1]	123,8[119,5;131,6]	131,1[121,3;132,7]	130,2[123,4;132,9]
31	128,0[121,5;132,1]	125,6[119,9;131,4]	129,7[119,0;132,2]	124,6[119,6;130,0]	131,4[123,5;133,0]	131,6[125,4;133,7]

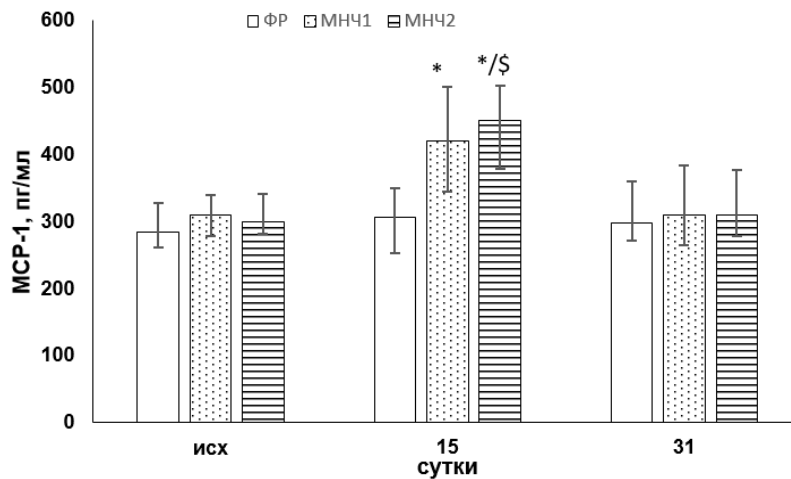
*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. \*P < 0,05 по сравнению с исходным значением; #P < 0,05 по сравнению с контролем на аналогичном этапе исследования.

На 15-е сутки после однократного внутривенного введения МНЧ1 и МНЧ2 у самцов крыс наблюдалось повышение уровней провоспалительных цитокинов - интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) (рисунок 40 А,Б), что можно рассматривать как проявление воспалительной реакции в ответ на введение МНЧ.

А.



Б.



**Рисунок 40 - Содержание моноцитарного хемотаксического фактора-1 (MCP-1) и интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) в плазме крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

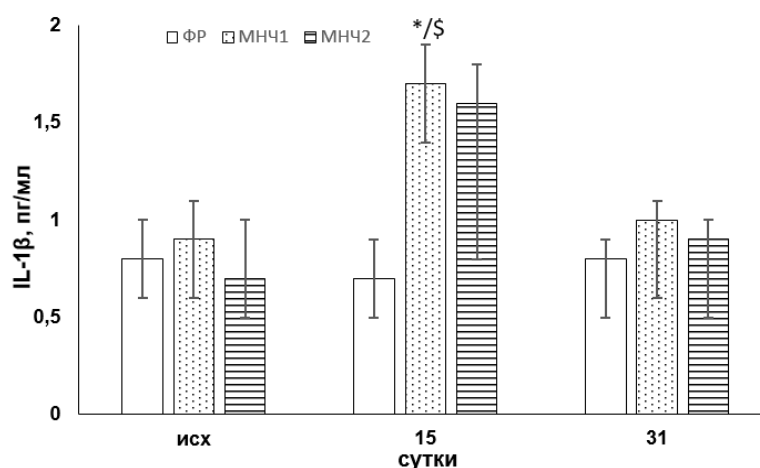
Примечание: ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. IL-1 $\beta$ ; Б. MCP-1. \*P < 0,05 по сравнению с контролем; §P < 0,05 по сравнению с исходным значением.



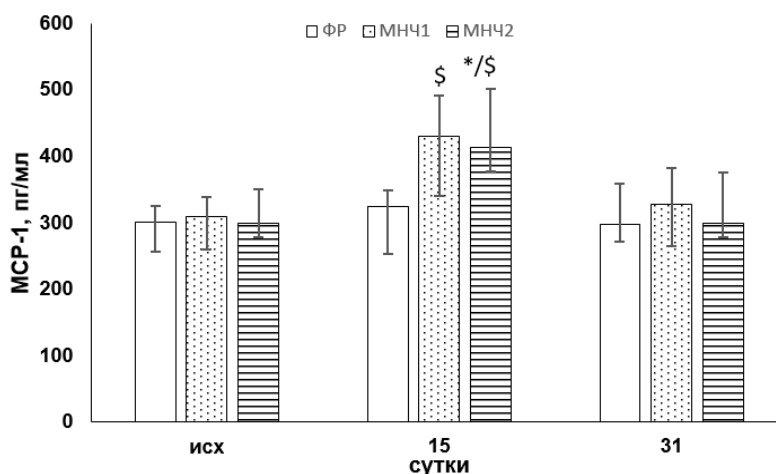
К окончанию эксперимента данные показатели возвращались к исходным значениям.

Ответ самок крыс на введение МНЧ1 и МНЧ2 был схож с таковым у самцов. В группах с введением исследуемых видов МНЧ самкам крыс отмечалось повышение уровней IL-1 $\beta$  и MCP-1 (на 15-е сутки) с их дальнейшим снижением до уровня исходных значений (рисунк 41 А,Б).

А.



Б.



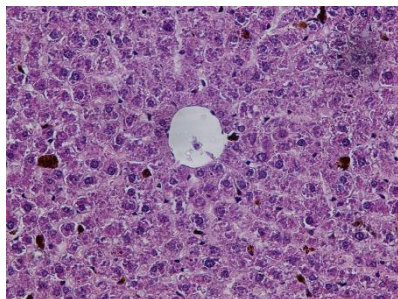
**Рисунок 41 - Содержание моноцитарного хемотаксического фактора-1 (MCP-1) и интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) в в плазме крови самок крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Примечание: ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. IL-1 $\beta$ ; Б. MCP-1. \*P < 0,05 по сравнению с контролем; §P < 0,05 по сравнению с исходным значением.

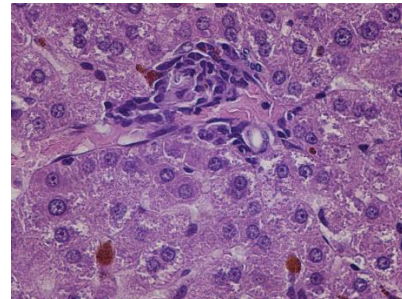
Следует отметить при этом отсутствие взаимосвязи между характером и выраженностью данных изменений и видом наночастиц.

На фоне введения самцам МНЧ2 массовые коэффициенты печени и почек (таблица 23) оказались достоверно ниже таковых в группе контроля, а также в группе с введением МНЧ1 ( $p < 0,05$ ). Остальные массовые коэффициенты органов самцов крыс опытных и контрольной групп не различались между собой. У самок крыс в группе с введением МНЧ2 отмечалось снижение выраженной в процентах от массы тела массы печени по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). При этом массовые коэффициенты других органов животных опытных и контрольной групп не различались между собой. Гистологическая картина печени крыс к 31 суткам после однократного введения МНЧ2 характеризовалась присутствием Перлс-позитивной макрофагальной инфильтрацией печеночных балок и образованием в зонах печеночных триад гранул из клеток Купфера (рисунок 42 А,Б).

А.



Б.



**Рисунок 42 - Печень крыс после однократного внутривенного введения немодифицированных композитных магнитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния**

*Примечание:* А. – Ув.  $\times 200$ ; Б. – Ув.  $\times 400$ . Окраска по Перлсу с докрасиванием гематоксилином и эозином.

При гистологическом исследовании остальных органов животных (самцов и самок) после однократного внутривенного введения отклонений от нормы не обнаружено.

**Таблица 23 - Массовые коэффициенты отдельных органов самцов и самок крыс после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Показатель	Группа					
	ФР		МНЧ1		МНЧ2	
	Самцы n=5	Самки n=5	Самцы n=8	Самки n=7	Самцы n=6	Самки n=6
Головной мозг, %	0,44±0,10	0,83±0,01	0,48±0,01	0,85±0,01	0,60±0,10	0,91±0,05
Легкие, %	0,49±0,02	0,65±0,01	0,48±0,03	0,65±0,05	0,50±0,04	0,59±0,04
Сердце, %	0,33±0,10	0,32±0,05	0,35±0,01	0,37±0,03	0,25±0,10	0,35±0,03
Печень, %	3,50±0,05	3,55±0,10	3,52±0,10	3,61±0,01	3,07±0,05*/#	3,06±0,10*/#
Селезенка, %	0,25±0,05	0,24±0,10	0,27±0,03	0,27±0,04	0,24±0,05	0,25±0,05
Почки, пара, %	0,67±0,04	0,69±0,02	0,63±0,02	0,71±0,01	0,53±0,03*/#	0,69±0,01

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. \*P < 0,05 по сравнению с контролем; #P < 0,05 по сравнению с МНЧ1.

Однократное внутривенное введение МНЧ1 и МНЧ2 самцам крыс не обеспечивало влияния на прирост их массы тела (интегрального показателя здоровья и развития животного) и потребление корма и воды, в то время как у самок групп МНЧ1 и МНЧ2 отмечалось равнозначное снижение данного показателя на фоне отсутствия влияния обоих видов наночастиц на потребление корма и воды. При этом потеря веса животных, вероятно, обусловлена снижением содержания жировой ткани, что может быть связано с повышением основного обмена в условиях токсического воздействия наночастиц (МНЧ1 и МНЧ2). В динамике наблюдения после однократного внутривенного введения крысам наночастиц отмечались проявления системной токсичности с воздействием на функции почек (о чем свидетельствуют результаты клинического анализа мочи), печени (биохимический анализ крови и патоморфологический анализ). На фоне введения МНЧ1 и МНЧ2 наблюдались признаки воспалительного процесса (IL-1 $\beta$ , MCP-1). В пользу большей токсичности МНЧ2 свидетельствуют следующие изменения, отсутствующие у животных с введением МНЧ1: снижение массовых коэффициентов (печень и почки – самцы, печень – самки), повышение уровня АЛТ и АСТ в крови животных, которые можно характеризовать как проявление гепатотоксического действия наночастиц.

Особого внимания заслуживают выявленные эффекты наночастиц на систему свертывания крови. Установлено, что однократное внутривенное введение наночастиц (МНЧ1 и МНЧ2) обуславливает равнозначное снижение коагуляционного потенциала крови через 31 сутки после введения. Данные изменения одинаковы как для самок, так и для самцов. Наиболее выраженный эффект при этом оказывают МНЧ2.

Отсутствие изменений у самцов и самок крыс со стороны протромбинового времени (ПТ), отражающего состояние внешнего пути активации коагуляционного гемостаза, в условиях однократного воздействия МНЧ1 и МНЧ2 может являться свидетельством неизменной активности витамин К-зависимых факторов (II, VII, X). Удлинение активированного

частичного тромбопластинного времени (АЧТВ), зависящего от количества плазменных факторов крови (XII, XI, IX, VIII, высокомолекулярного кининогена, прекалликреина), на фоне воздействия исследуемых видов наночастиц может являться следствием дефицита данных факторов, обуславливающего, в конечном счете, снижение коагуляционного потенциала. С учетом отсроченности эффекта (31-е сутки после однократного введения наночастиц), версия о возможном взаимодействии наночастиц с факторами свертывания, задействованных во внутреннем механизме коагуляции, представляется маловероятной ввиду предположительной биodeградации/элиминации наночастиц к моменту окончания эксперимента (о чем свидетельствуют результаты гистологического анализа с окраской по Перлсу). Можно предполагать, что вероятный дефицит плазменных факторов обусловлен гепатотоксическим действием наночастиц (которое более выражено у МНЧ2). Снижение у самок и самцов крыс тромбинового времени (ТТ), отражающего общий путь коагуляционного гемостаза и зависящего от уровня и структуры фибриногена, также свидетельствует о гипокоагуляционных сдвигах, обусловленных дисбалансом анти- и прокоагулянтов, реализующих конечный этап свертывания крови и/или токсическим поражением печени в условиях воздействия МНЧ2.

Также одним из возможных механизмов, задействованных в реализации вышеописанных нарушений, может являться снижение агрегации эритроцитов в условиях воздействия наночастиц магнетита и композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния. Данное предположение основано на полученных результатах по исследованию гемосовместимости наночастиц (раздел 3.3). Однако данные, полученные в ходе гематологического анализа крови, позволяют пренебречь возможностью вклада в вышеописанные изменения модулирования реологических свойств крови (вязкости) за счет изменения количества эритроцитов или гематокрита.

Таким образом, однократное внутривенное введение крысам наночастиц магнетита (МНЧ1) и композитных наночастиц с оболочкой из диоксида

кремния (МНЧ2) в динамике 31-дневного наблюдения вызывает снижение содержания жировой ткани, приостановление набора массы тела, а также характеризуется наличием признаков воспаления, повреждением почек и печени и гипокоагуляционным сдвигом. Более значительные нарушения вызываются однократным введением МНЧ2.

Для определения оказываемых системных эффектов МНЧ при их многократном внутривенном введении использовали МНЧ в двух дозах: 30,0 мг/кг и 60,0 мг/кг для МНЧ1 и 10,0 мг/кг и 30,0 мг/кг для МНЧ2 (с учетом более выраженного по сравнению с МНЧ1 токсического действия МНЧ2, показанного на предварительном этапе подбора доз). МНЧ вводили ежедневно в течение 7 дней. Дискретные точки соответствовали 15-м и 31-м суткам после последнего введения МНЧ.

У животных (самцы и самки) с введением МНЧ2 в дозе 30,0 мг/кг, в течение первых суток после введения отмечали тремор, угнетение двигательной активности. Все животные данной группы погибли в первые трое суток эксперимента, то есть после третьего введения (*таблица 24*).

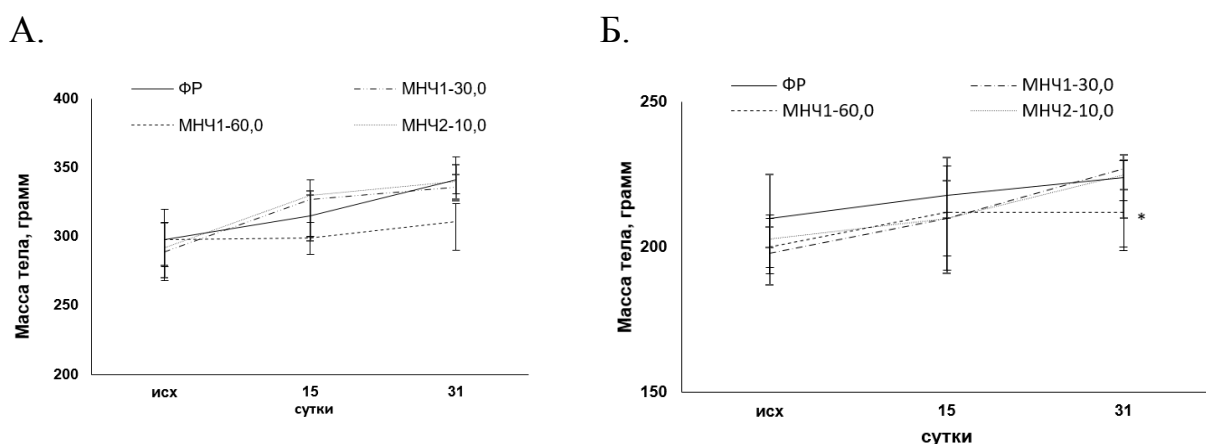
**Таблица 24 - Сводные данные смертности крыс после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Доза, мг/кг	Исходное количество животных		Количество погибших животных	
	самцы	самки	самцы	самки
МНЧ1				
30,0	6	6	0	0
60,0	6	6	0	0
МНЧ2				
10,0	6	6	0	0
30,0	7	7	7	7

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния.

При введении меньшей дозы МНЧ2 (10,0 мг/кг) выживаемость животных составила 100 %.

В группах с введением МНЧ1 в дозах 30,0 мг/кг и 60,0 мг/кг гибели животных не наблюдалось. У самцов и самок контрольной группы в динамике эксперимента наблюдалось увеличение массы тела в пределах физиологической (и внутрилабораторной) нормы (рисунки 43 А, Б) [26].



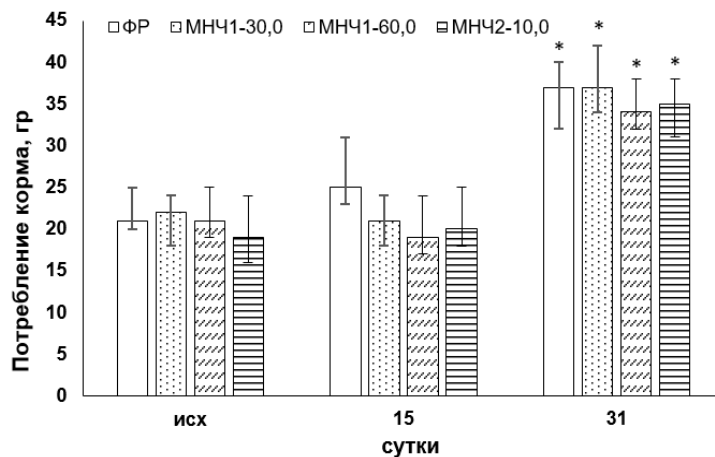
**Рисунок 43 - Динамика массы тела экспериментальных животных после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. Самцы; Б. Самки. Примечание: \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем.

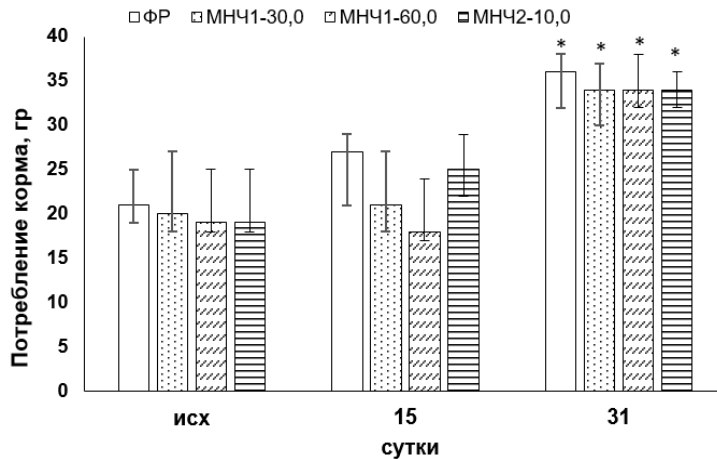
После введения МНЧ1 в меньшей дозе (30,0 мг/кг) и МНЧ2 (10,0 мг/кг) в динамике эксперимента отмечался прирост массы тела самцов и самок крыс, соответствующий таковому в контрольной группе,  $p > 0,05$ . В группах с введением самцам и самкам МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг к 31-м суткам после введения отмечалось приостановление нарастания массы тела, при этом в группе самок данный эффект введения наночастиц носил достоверный характер ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем).

В ходе исследования контрольных группах наблюдалось увеличение потребления корма и воды, на момент окончания эксперимента (31-е сутки) данные показатели достоверно превышали исходные значения ( $p > 0,05$ ). В опытных группах (самцы и самки) с введением МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 показатели потребления животными корма и воды находились в диапазоне контрольных значений,  $p > 0,05$  (рисунок 44 А,Б, рисунок 45 А,Б).

А.



Б.

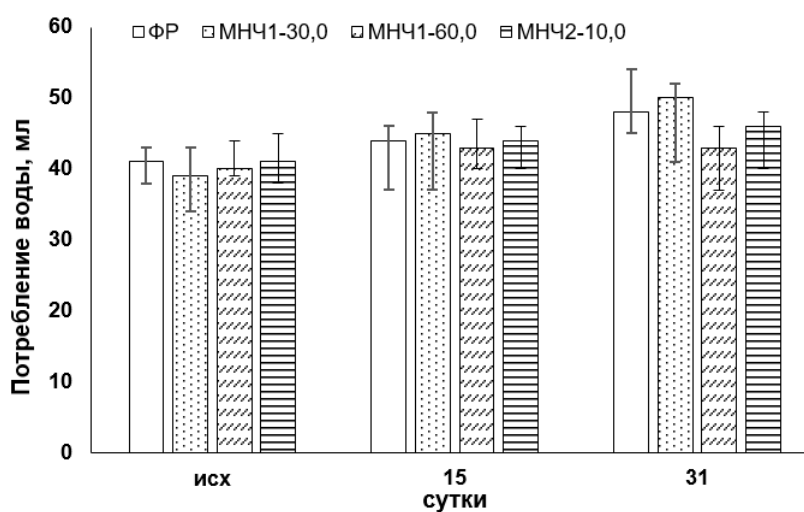


**Рисунок 44 - Динамика изменения потребления корма после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

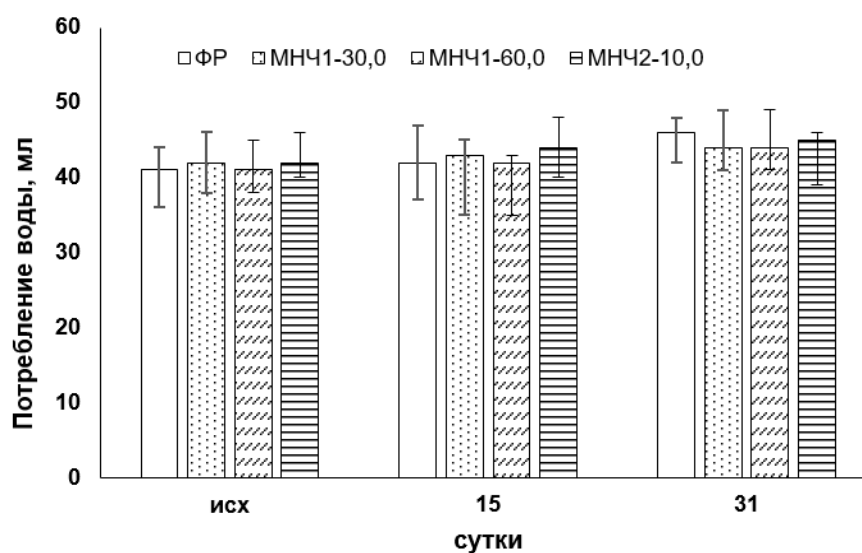
*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. Самцы; Б. Самки. \* $P < 0,05$  по сравнению с исходными значениями.



А.



Б.

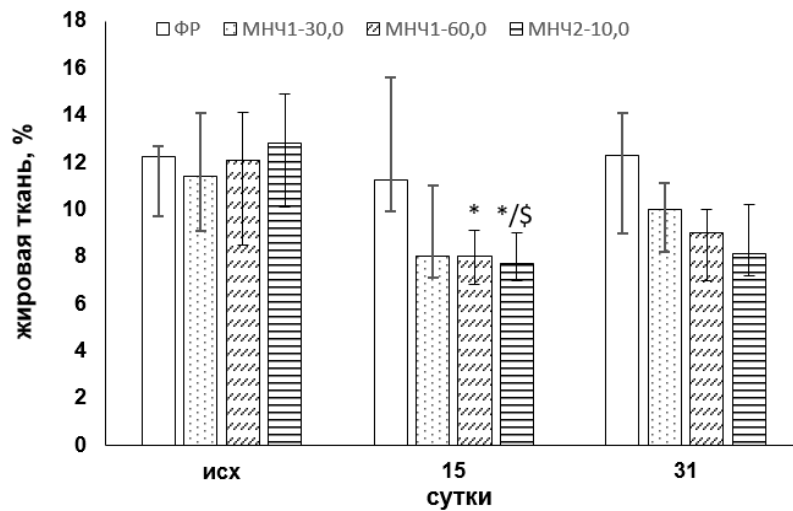


**Рисунок 45 - Динамика изменения потребления воды после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

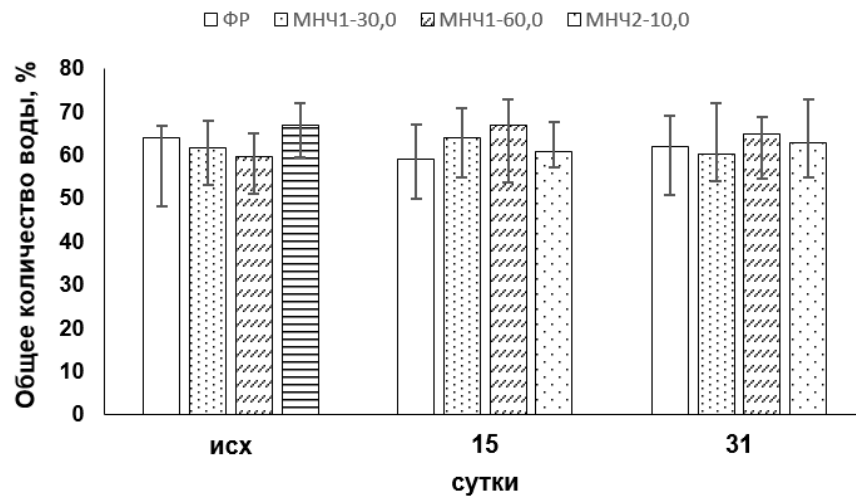
*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. Самцы; Б. Самки.

В динамике эксперимента у самцов и самок крыс с введением МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг наблюдались сходные изменения компонентного состава тела (*рисунок 46 А,Б и рисунок 47 А,Б*).

А.



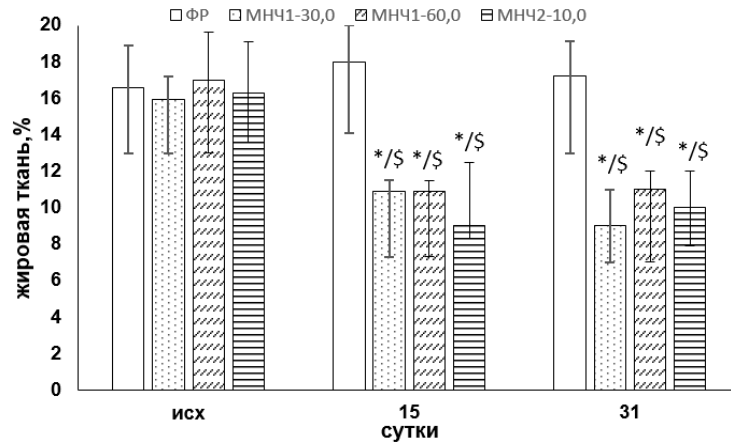
Б.



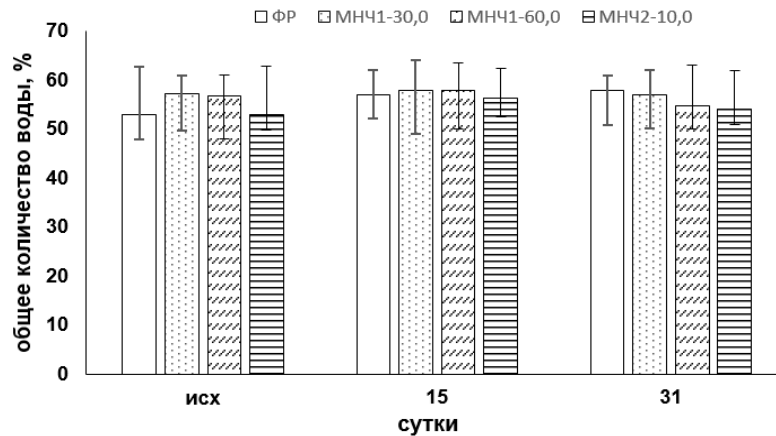
**Рисунок 46 - Компонентный состав тела самцов крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. Жировая ткань; Б. Общее количество воды. \*P < 0,05 по сравнению с группой контроля, \$P < 0,05 по сравнению с исходным значением.

А.



Б.



**Рисунок 47 - Компонентный состав тела самок крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. Жировая ткань; Б. Общее количество воды. \* $P < 0,05$  по сравнению с группой контроля,  $^{\$}P < 0,05$  по сравнению с исходным значением.

Так, уровень общего количества воды в организме самцов и самок крыс всех исследуемых групп в ходе эксперимента оставались на постоянном уровне, соответствующем исходному и не отличались от контроля. При этом в динамике наблюдалось снижение процента жировой ткани, которое на

момент окончания эксперимента (31-е сутки) проявлялось в виде недостоверной тенденции в группах самцов (МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг) и в виде достоверного ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем) снижения в группах самок (МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг,  $p > 0,05$  между группами).

На фоне введения меньших доз МНЧ1 (30,0 мг/кг) показатели лабораторного анализа мочи крыс находились в пределах нормы, не отличаясь от группы контроля (*таблица 25*).

У части самцов и самок крыс группы с введением МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг в моче обнаруживался белок, наличие которого в совокупности с гематурией может свидетельствовать о воспалительной реакции. Повышенное содержание билирубина и уробилиногена в моче части животных с введением МНЧ2 и МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг может быть обусловлено разрушением эритроцитов вследствие возможного токсического действия наночастиц на клетки крови либо их гепатотоксическим действием. Обнаруженные в образцах группы МНЧ2 кетоны косвенно могут свидетельствовать о воспалительной реакции организма в условиях введения наночастиц.

В ходе эксперимента гематологические показатели в опытных группах с введением МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг (МНЧ1-30 и МНЧ1-60, соответственно) были близки по значениям ( $p > 0,05$ ) с показателями контрольных групп (группы ФР, самки и самцы) (*таблица 26*). В то же время на фоне введения МНЧ2 в ходе эксперимента у самцов и самок крыс наблюдалось повышение уровня лейкоцитов с увеличением процента гранулоцитов и моноцитов, что может отражать воспалительный процесс в организме животных.

На фоне введения МНЧ1 в дозе 30,0 мг/кг в динамике эксперимента биохимические показатели крови самок и самцов не изменялись (*таблица 27*), оставаясь в диапазоне контрольных значений ( $p > 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем). При использовании больших доз МНЧ1 (60,0 мг/кг) на 15-е сутки после последнего введения у самок

наблюдалось повышение активности АСТ ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным), которое сохранялось на момент окончания эксперимента, 31-е сутки ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем). Остальные биохимические показатели крови, полученной от самок данной группы, в динамике эксперимента оставались в диапазоне физиологической нормы ( $p > 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем). Показатели биохимического анализа крови самцов на фоне введения МНЧ1-60 в ходе эксперимента оставались без изменений относительно контрольных и исходных значений ( $p > 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем). При введении МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг у самок и самцов на 15-е сутки после последнего введения наблюдалось достоверное повышение активности АЛТ, сохраняющееся к 31-м суткам (у самок и самцов –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, по сравнению с исходным), а также повышение уровня АСТ. Так, у самок группы МНЧ2-10 изменения активности АСТ наблюдались с 15-х суток после последнего введения ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным) и сохранялись к окончанию эксперимента (31-е сутки,  $p < 0,05$  по сравнению с исходным).

У самцов с введением МНЧ2 наблюдалось повышение данного показателя к 31-м суткам после последнего введения ( $p > 0,05$  по сравнению с исходным). У самок данной группы также отмечалось достоверное повышение уровня общего билирубина на момент окончания эксперимента (31-е сутки,  $p > 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем). Других изменений биохимических показателей крови в группах самок и самцов с введением МНЧ2 не наблюдалось.

**Таблица 25 - Показатели мочи крыс (самцы и самки) после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц различного состава**

Показатели	Группы							
	МНЧ1-30,0		МНЧ1-60,0		МНЧ2-10,0		ФР	
	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6
Билирубин, мг/дл есть (+), нет(-)	-	-	+ - у 50% (3 животных)	+ - у 16% (1 животное)	+ - у 33% (2 животных)	-	-	-
Уробилиноген, мг/дл есть (+), нет(-)	-	-	+ - у 33% (2 животных)	+ - у 33% (2 животных)	+ - у 50% (3 животных)	+ - у 33% (2 животных)	-	-
Кетоновые тела, мг/дл есть (+), нет(-)	-	-	-	-	+ - у 50% (3 животных)	+ - у 16% (1 животное)	-	-
Глюкоза, мг/дл	-	-	-	-	-	-	-	-
Белок, мг/дл	-	-	4,8 - у 16% (1 животное)	-	-	-	-	-
Кровь, эр/мкл	-	-	+ - у 50% (3 животных)	+ - у 16% (1 животное)	-	-	-	-
рН	7,0[6,9;7,3]	7,1[6,7;7,6]	7,0[6,7;7,5]	7,1[6,8;7,6]	7,1[6,9;7,5]	7,2[7,0;7,3]	7,1 [7,0;7,5]	7,2[7,0;7,4]
Лейкоциты	-	-	-	-	-	-	-	-
Удельный вес, г/мл	1,028 [1,025;1,030]	1,025 [1,024;1,027]	1,027 [1,026;1,031]	1,025 [1,023;1,026]	1,028 [1,026;1,031]	1,024 [1,023;1,029]	1,029 [1,025;1,030]	1,026 [1,024;1,031]

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг.

**Таблица 26 - Гематологические показатели крыс (самцы и самки) на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц различного состава**

	Группа							
	ФР		МНЧ1-30,0		МНЧ1-60,0		МНЧ2-10,0	
	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6
Лейкоциты, WBC, г/л								
исх	7,1[6,9;10,4]	5,2[4,2;6,7]	6,9[5,9;7,9]	5,9[4,8;6,7]	5,4[4,7;7,4]	4,0[3,8;6,4]	6,8[5,7;8,8]	4,1[3,3;7,5]
15	6,4[6,3;6,4]	4,8[4,8;5,7]	6,4[6,0;8,3]	4,5[3,4;6,1]	7,2[6,6;7,8]	10,8[7,6;12,8]	10,8[10,1;11,6] <sup>*S</sup>	6,4[5,8;6,5]
31	6,8[6,2;7,4]	4,7[4,0;5,3]	6,2[5,2;7,1]	4,7[4,3;7,8]	7,3[6,7;8,1]	5,6[4,1;6,3]	10,1[9,1;11,1] <sup>S</sup>	2,8[2,5;4,0]
Гранулоциты, Gr%								
исх	18,9[14,0;24,4]	22,0[20,6;24,1]	19,2[16,3;24,0]	21,5[21,0;21,8]	25,5[23,4;26,0]	14,7[12,0;18,9]	22,6[20,8;24,3]	23,1[21,6;24,9]
15	20,7[17,6;23,9]	18,0[17,9;19,2]	23,7[23,6;30,2]	20,8[18,6;22,6]	38,0[34,9;40,9] <sup>*</sup>	22,9[18,0;24,0]	13,9[11,2;16,5] <sup>*</sup>	22,7[16,85;27,75]
31	18,9[17,9;20,6]	22,0[20,45;23,6]	20,8[20,0;21,7]	19,6[17,3;25,5]	25,3[20,5;25,8]	27,4[22,9;30,9]	10,8[10,5;10,9] <sup>*S</sup>	16,1[15,95;19,1]
Моноциты, Мi%								
исх	5,3[3,5;6,7]	7,4[6,9;8,3]	4,9[6,6;10,5]	7,9[7,3;10,3]	6,9[6,1;8,8]	6,7[5,8;8,7]	6,6[5,0;9,3]	6,8[6,6;9,4]
15	7,3[6,5;9,2]	7,0[4,7;7,9]	9,2[7,5;9,9]	11,3[7,5;12,3]	7,5[6,8;8,2]	7,2[5,9;9,8]	8,9[7,4;9,5]	8,1[6,8;9,5]
31	6,3[3,9;7,5]	6,5[5,2;7,7]	6,4[5,8;10,3]	8,5[8,1;9,9] <sup>*</sup>	6,5[4,8;8,5]	7,9[6,3;9,3]	10,1[8,5;11,8] <sup>*</sup>	10,5[9,6;12,3] <sup>*S</sup>
Лимфоциты, Lym%								
исх	73,8[71,3;76,5]	69,4[67,9;69,9]	72,7[68,5;77,0]	68,7[67,0;77,8]	75,8[70,1;79,3]	80,9[74,6;83,4]	72,6[72,6;73,4]	68,1[64,25;69,6]
15	70,1[68,2;73,9]	71,2[70,0;74,4]	70,0[60,6;72,9]	67,9[65,2;73,9]	69,2[68,8;73,5]	73,4[67,2;78,1]	72,7[70,3;84,2]	68,8[67,7;76,25]
31	75,5[72,4;77,1]	74,5[72,8;76,3]	73,3[68,1;74,4]	69,2[66,2;72,9]	65,6[62,4;74,1]	67,6[64,4;75,3]	70,8[64,3;81,2]	70,3[64,8;78,8]
Эритроциты, RBC, 10 <sup>12</sup> /л								
исх	7,3[6,9;7,5]	7,2[6,1;8,2]	7,8[6,1;8,1]	7,4[7,3;7,7]	7,9[7,2;8,9]	7,5[7,4;7,9]	7,5[7,3;8,1]	7,3[7,0;7,5]
15	7,2[7,1;7,6]	7,9[7,6;8,5]	7,4[7,0;8,5]	7,0[6,5;7,3]	6,9[6,6;8,0]	6,6[6,6;7,9]	7,3[7,0;8,4]	6,9[6,1;7,0]
31	7,4[7,0;8,7]	7,6[7,2;7,7]	7,8[6,9;8,6]	7,5[7,1;7,7]	8,1[7,2;8,2]	6,5[6,4;7,3]	8,6[7,2;8,8]	6,6[6,3;7,6]
MCH,pg								
исх	19,4[19,1;20,0]	18,4[17,8;18,8]	18,9[18,5;19,7]	18,9[17,75;20,0]	19,4[19,0;19,5]	20,2[18,8;21,4]	19,5[18,8;20,8]	19,9[19,5;20,7]
15	20,3[20,0;21,3]	18,5[17,5;20,1]	19,7[19,1;21,2]	20,8[18,4;21,4]	18,8[18,6;19,9]	20,2[19,6;21,2]	19,9[19,5;21,1]	20,3[19,7;21,5]
31	20,1[19,7;21,2]	19,8[18,2;20,45]	19,2[18,6;21,6]	19,9[18,8;20,8]	19,5[18,3;21,5]	19,9 [19,0;22,1]	18,8[17,3;19,9]	20,1[19,8;21,5]
MCV,fl								
исх	61,0[59,7;62,5]	59,0[58,5;62,0]	60,5[59,2;61,5]	61,0[58,5;62,3]	58,7[57,7;60,4]	60,0[59,1;61,3]	58,5[58,3;59,9]	59,9[57,3;63,1]
15	61,5[61,0;61,8]	57,2[56,5;61,0]	60,0[57,5;62,5]	60,0[58,4;62,7]	58,5[58,0;59,8]	61,0[60,5;62,1]	58,1[57,6;59,7]	61,1[59,7;63,5]

Продолжение таблицы 26

31	59,5[56,5;60,3]	61,5[59,3;63,8]	58,5[57,5;60,6]	60,4[57,0;63,5]	57,7[56,5;59,3]	61,8[60,8;64,6]	56,6[54,6;58,0]	60,2[56,3;61,0]
МНС, г/л								
исх	317,1[315,5;321,5]	316,9[294,5;320,3]	316,5[304,5;317,5]	312,8[306,5;314,2]	314,4[312,9;334,5]	312,5[310,6;332,2]	321,0[317,1;327,5]	318,6[317;321,0]
15	325,3[322,1;330,0]	320,0[308,5;329,2]	320,7[306,5;331,5]	318,7[317,5;323,5]	323,5[321,8;325,2]	322,1[320,5;334,5]	320,2[318,5;330,5]	323,0[319,5;330,0]
31	321,9[318,4;332,5]	321,8[320,8;323,5]	326,1[322,5;334,1]	319,6[307;321,5]	330,0[323,6;331,5]	317,5[311,0;325,1]	327,5[318,7;334,5]	320,1[318,9;330,8]
Гемоглобин, Нб, г/л								
исх	140,0[136,5;152,1]	143,0[140,1;152,5]	143,5[140,5;149,5]	143,8[142,8;148,5]	150,0[143,1;153,5]	149,1[142,4;153,2]	144,6[132,9;155,1]	146,1[144,5;157,0]
15	143,1[135,9;147,9]	145,3[139,1;157,2]	144,5[143,5;147,5]	140,3[140,0;147,3]	145,5[130,7;144,8]	135,9[130,5;148,3]	145,5[142,0;149,8]	131,7[129,5;141,5]
31	147,0[138,3;150,1]	139,8[136,9;154,3]	147,5[140,5;154,3]	148,0[139,5;152,2]	153,1[138,0;155,5]	150,0[148,25;153,25]	142,9[131,6;153,0]	149,1[138,1;152,5]
Гематокрит, НСТ,%								
исх	46,1[42,5;47,9]	48,4[47,1;50,3]	46,9[45,1;48,9]	46,2[44,3;48,3]	45,6[45,0;46,8]	44,4[43,4;45,6]	43,4[41,0;45,72]	42,1[41,3;45,1]
15	44,2[43,8;47,6]	47,9[46,9;49,0]	44,6[43,0;45,1]	44,5[43,3;46,4]	41,2[40,6;45,8]	42,2[40,0;46,8]	42,7[42,3;43,0]	42,6[40,3;47,2,83]
31	42,1[41,29;45,9]	46,8[45,5;48,1]	43,9[42,5;45,7]	43,4[42,6;44,9]	46,2[44,0;46,9]	42,2[41,1;45,3]	42,6[41,3;45,9]	41,7[41,2;45,3]
Тромбоциты, PLT, 10 <sup>12</sup> /л								
исх	500,1[488,1;545,3]	509,3[480,4;540,0]	507,8[488,2;551,2]	497,0[474,1;548,8]	505,4[483,0;540,2]	490,7[475,6;549,0]	500,6[485,0;540,2]	512,1[477,1;551,3]
5	510,0[487,0;556,7]	495,0[487,1;551,1]	497,7[477,6;559,3]	512,1[487,1;544,7]	510,0[487,0;556,7]	501,5[480,2;548,2]	490,0[487,1;550,1]	490,0[479,1;544,2]
31	499,0[476,8;541,2]	510,4[477,0;532,0]	500,4[477,1;530,0]	497,0[487,1;524,9]	5005,4[480,1;540,2]	512,6[470,0;539,2]	508,5[485,1;543,2]	519,0[481,4;551,0]

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. \*P < 0,05 по сравнению с контролем на аналогичном этапе эксперимента; <sup>§</sup>P < 0,05 по сравнению с МНЧ1-30 и МНЧ1-60,0 на аналогичном этапе эксперимента.

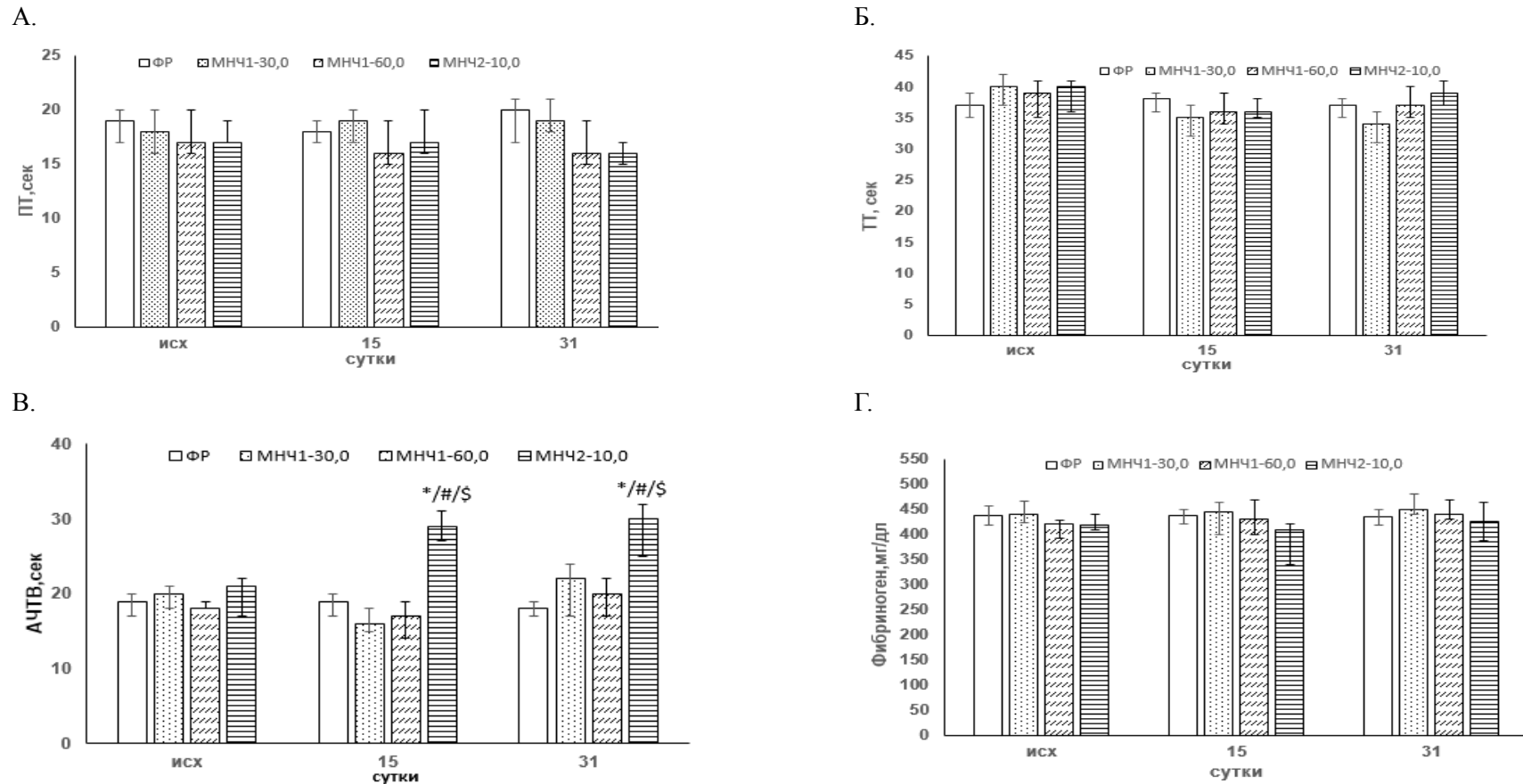


**Таблица 27 - Показатели биохимического анализа крови крыс (самцы и самки) на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц различного состава**

	Группа							
	ФР		МНЧ1-30,0		МНЧ1-60,0		МНЧ2-10,0	
	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6
АЛТ, Ед/л								
исх	61,2[56,0;67,2]	58,9[48,5;65,5]	64,6[55,2;67,5]	56,1[54,1,5;59,5]	59,0[53,5;73,5]	56,0[54,2;58,5]	61,5[60,8;63,3]	52,7[51,5;58,5]
15	72,0[66,5;73,2]	68,2[65,6;72,9]	59,9[52,5;67,8]	70,0[65,2;72,3]	61,0[56,5;71,0]	69,9[67,5;76,1]	108,0[104,1;112,0] <sup>*/#&amp;</sup>	69,8[67,1;75,0] <sup>*</sup>
31	64,3[58,7;67,5]	59,9[55,5;66,1]	59,9[49,1;65,5]	57,4[56,2;63,0]	68,3[54,5;78,0]	66,0[64,1;69,5]	94,0[75,5;102,5] <sup>*/#</sup>	68,4[67,5;71,5] <sup>*/#</sup>
АСТ, Ед/л								
исх	130,1[125,9;147,1]	110,0[97,5;126,5]	117,9[110,8;128,3]	112,0[110,5;124,0]	124,5[120,5;137,1]	116,1[110,0;127,5]	110,5[107,8;122,8]	98,2[94,5;113,5]
15	137,9[137,0;147,5]	123,2[112,7;139,5]	135,8[127,5;152,6]	122,1[121,0;126,3]	134,1[132,3;157,0]	132,1[131,0;138,9] <sup>*</sup>	124,0[121,3;137,0]	120,1[114,1;133,5] <sup>*</sup>
31	139,6[138,0;153,0]	98,9[97,3;127,9]	131,6[122,1;148,5]	116,6[100,5;121,7]	143,0[131,1;156,7]	133,2[136,0;140,5] <sup>*/#</sup>	118,1[116,1;130,1] <sup>*</sup>	125,1[119,4;135,5] <sup>*</sup>
Билирубин общий, мг/дл								
исх	0,5[0,5;0,8]	0,6[0,6;0,9]	0,7[0,6;1,1]	0,5[0,3;0,8]	1,0[0,7;1,1]	0,9[0,8;1,1]	0,7[0,6;1,1]	1,0[0,8;1,2]
15	0,9[0,9;1,2]	0,6[0,5;0,8]	0,6[0,4;0,9]	0,6[0,5;0,8]	0,5[0,3;0,9]	0,6[0,6;0,7]	0,7[0,6;1,3]	0,6[0,6;0,9]
31	0,9[0,9;1,1]	0,8[0,8;0,9]	0,8[0,8;0,9]	0,8[0,7;1,0]	1,0[0,7;1,1]	0,9[0,8;1,2]	0,9[0,7;1,1]	1,5[1,4;1,7] <sup>*/#</sup>
Общий белок, г/дл								
исх	5,7[4,4;6,8]	5,6[5,4;6,2]	6,2[6,1;6,3]	6,9[5,1;7,1]	5,7[5,1;6,8]	6,2[6,0;6,3]	5,9[5,8;6,0]	6,0[5,6;6,8]
15	6,1[5,8;7,1]	6,0[6,0;6,4]	6,0[5,4;6,2]	6,7[6,0;6,8]	6,1[5,8;6,7]	6,1[5,9;6,4]	6,3[6,2;6,4]	6,8[6,3;7,2]
31	5,9[5,0;6,7]	5,7[5,1;7,4]	5,4[5,2;5,8]	5,6[5,5;6,2]	6,4[5,2;7,6]	5,6[5,3;6,4]	5,8[4,8;6,9]	6,7[5,6;7,9]
Глюкоза, мг/дл								
исх	123,4[121,5;132,1]	120,6[119,4;131,0]	122,6 [120,0;130,1]	121,0[120,6;127,3]	122,4[120,0;131,3]	120,3[119,1;129,4]	123,3[120,1;129,8]	122,3[120,0;130,1]
15	121,3[118,6;130,1]	126,4[120,1;133,5]	124,4[118,0;132,7]	123,2[120,5;131,1]	129,2[122,0;131,6]	124,4[121,1;133,1]	127,7[119,1;133,1]	126,4[121,0;133,1]
31	124,0[120,5;133,3]	124,6[120,9;132,1]	127,7[119,4;134,2]	125,6[120,6;131,1]	124,4[122,4;130,0]	125,7[120,9;134,4]	127,0[120,1;133,4]	127,6[120,9;130,2]

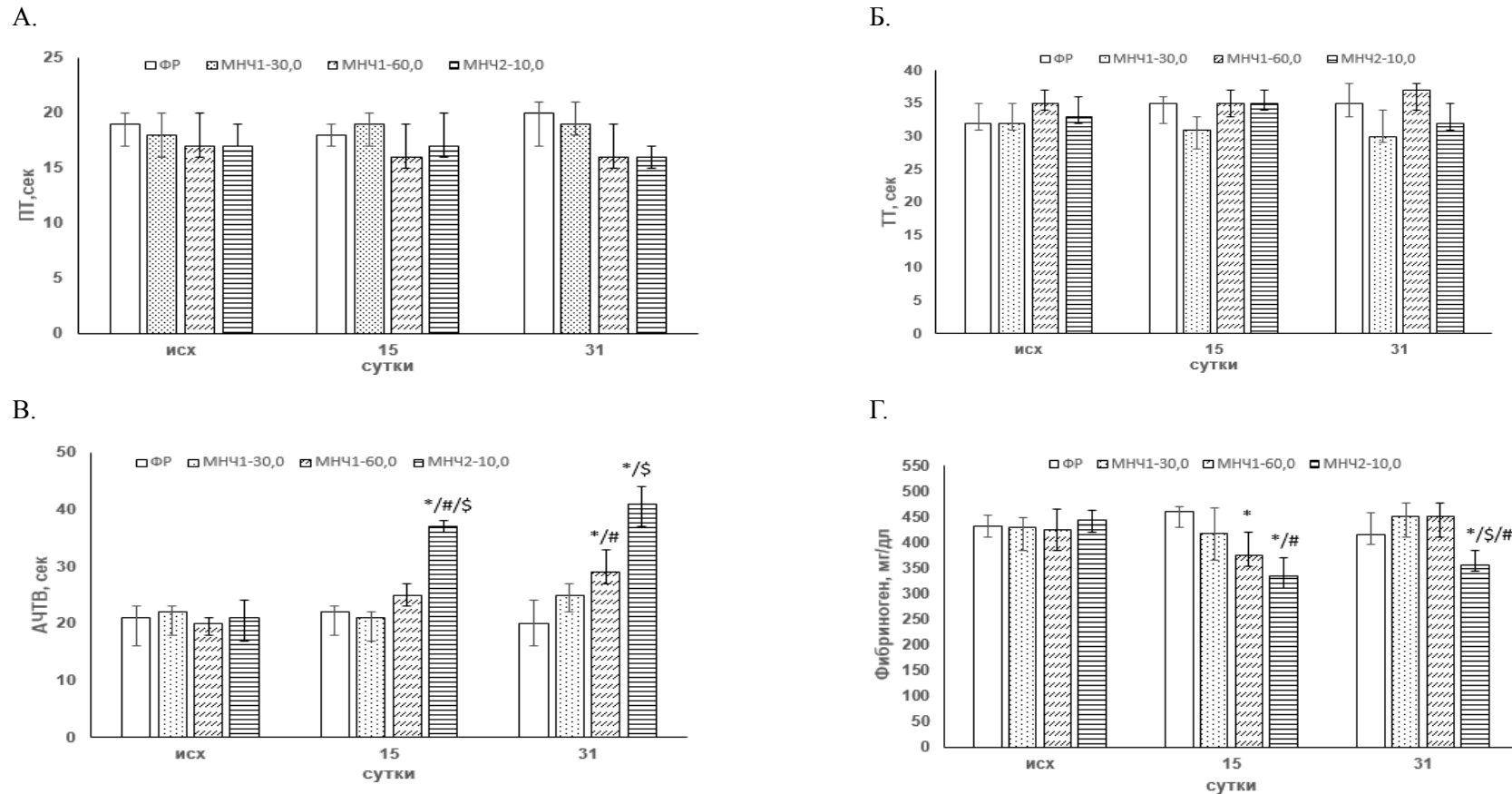
*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. \*P < 0,05 по сравнению с исходным; #P < 0,05 по сравнению с контролем на аналогичном этапе эксперимента; \$P < 0,05 по сравнению с МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 на аналогичном этапе эксперимента.

В условиях многократного воздействия МНЧ1 (30,0 и 60,0 мг/кг) и МНЧ2 у самцов изменения активности процессов внешнего и общего каскада систем свертывания крови не наблюдалось, о чем свидетельствовали показатели протромбинового времени (ПТ) (*рисунок 48 А*), тромбинового времени (ТТ) (*рисунок 48 Б*) и уровень фибриногена (*рисунок 48 Г*), которые на всех этапах эксперимента оставались на уровне исходных значений и не отличались от контроля ( $p > 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем). Однако при этом наблюдались изменения в процессах внутреннего пути свертывания крови. Так, на 15-е сутки после последнего введения МНЧ2 наблюдалось достоверное повышение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем, по сравнению с МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 на аналогичном этапе эксперимента), сохраняющееся к 31-м суткам эксперимента (*рисунок 48 В*). В условиях многократного воздействия МНЧ1 (30,0 и 60,0 мг/кг) и МНЧ2 у самок показатели ПТ, ТТ на всех этапах эксперимента оставались на уровне исходных значений и не отличались от контроля ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем) (*рисунок 49 А,Б*). Однако на 15-е сутки после последнего введения МНЧ2 наблюдалось достоверное повышение АЧТВ (*рисунок 49 В*), ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем, по сравнению с МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 на аналогичном этапе эксперимента), сохраняющееся к 31-м суткам эксперимента. Также в данной группе на указанных этапах эксперимента отмечалось снижение уровня фибриногена ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем), который на момент окончания эксперимента был достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже такового в группах МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 (*рисунок 49 Г*). Введение самкам крыс МНЧ1 в большей дозе (60,0 мг/кг) вызывало к 31-м суткам повышение АЧТВ ( $p < 0,05$  по сравнению с исходным, по сравнению с контролем), а также снижение уровня фибриногена (15-е сутки,  $p < 0,05$  по сравнению с контролем), проходящее к моменту окончания эксперимента ( $p > 0,05$  по сравнению с исходным).



**Рисунок 48 - Плазменные показатели гемостаза крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. Протромбиновое время; Б. Тромбиновое время; В. Активированное частичное тромбопластиновое время; Г. Концентрация фибриногена. \* $P < 0,05$  по сравнению с исходным; # $P < 0,05$  по сравнению с контролем на аналогичном этапе эксперимента; \$ $P < 0,05$  по сравнению с МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 на аналогичном этапе эксперимента.

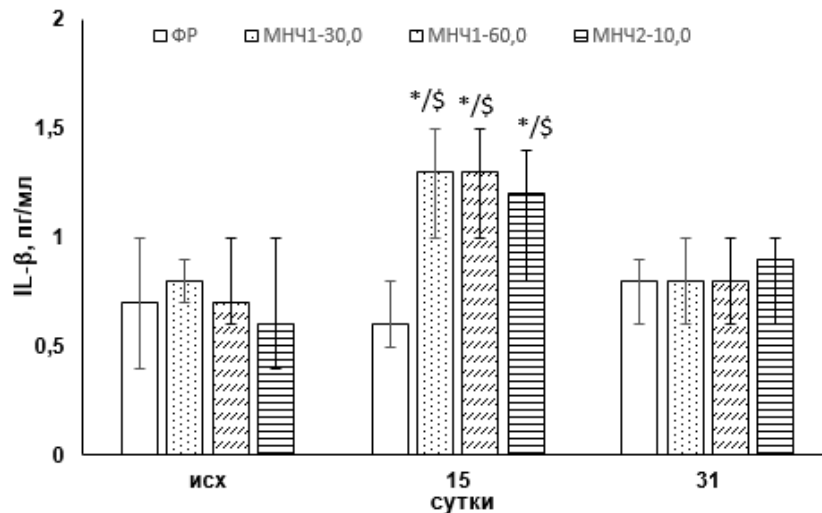


**Рисунок 49 - Плазменные показатели гемостаза крови самок крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

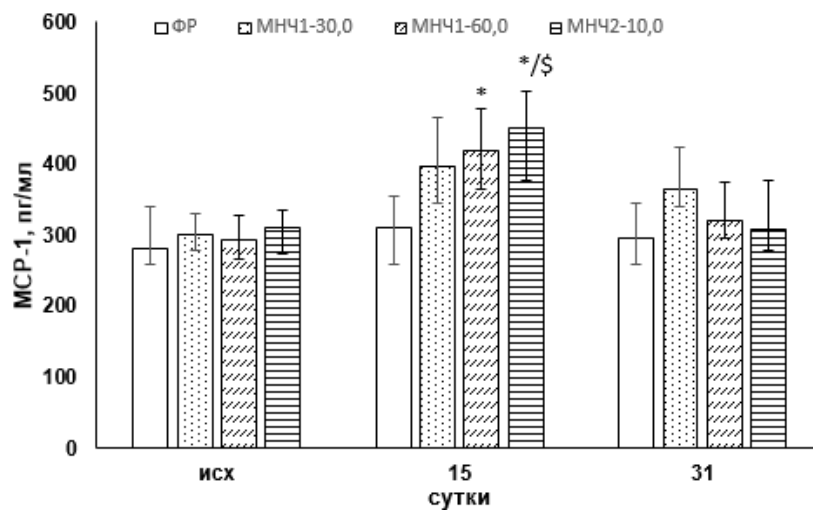
*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. Протромбиновое время; Б. Тромбиновое время; В. Активированное частичное тромбопластиновое время; Г. Концентрация фибриногена. \*P < 0,05 по сравнению с исходным; #P < 0,05 по сравнению с контролем на аналогичном этапе эксперимента; \$P < 0,05 по сравнению с МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 на аналогичном этапе эксперимента.

На 15-е сутки после последнего внутривенного введения МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг у самцов крыс наблюдалось повышение уровней IL-1 $\beta$  и МСР-1 (рисунки 50 А,Б), что может отражать воспалительный ответ на введение МНЧ.

А.



Б.



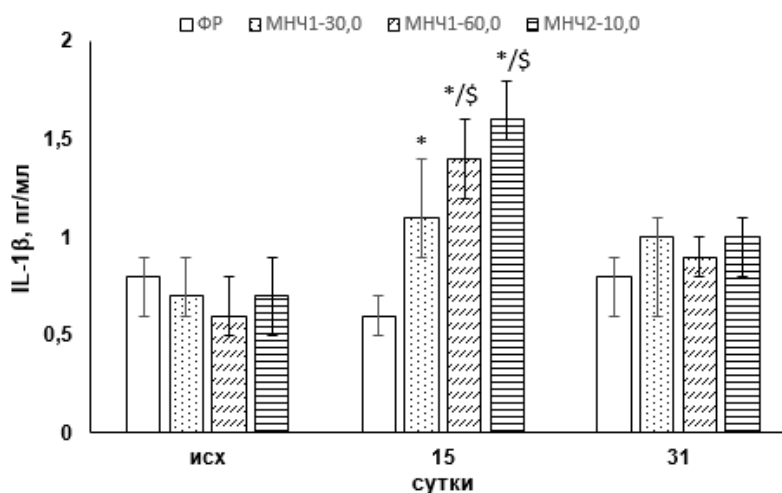
**Рисунок 50 - Содержание IL-1 $\beta$  и МСР-1 в плазме крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. IL-1 $\beta$ ; Б. МСР-1. \*P < 0,05 по сравнению с контролем; \$P < 0,05 по сравнению с исходным значением.

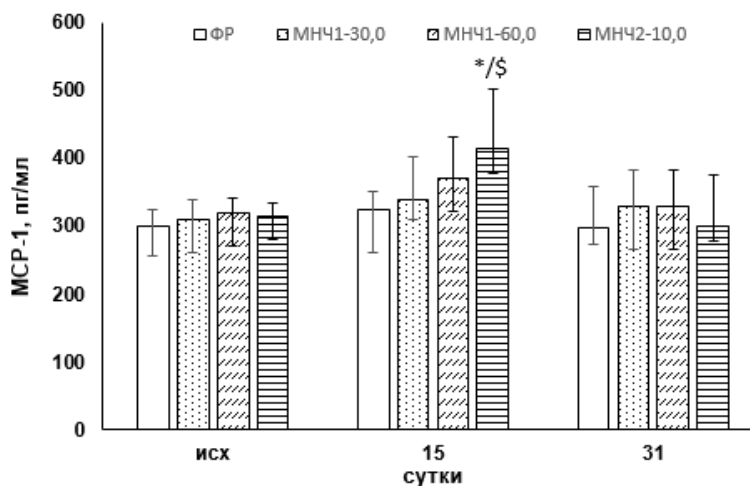
К окончанию эксперимента данные показатели возвращались к исходным значениям.

В группах с введением исследуемых видов МНЧ самкам крыс отмечалось повышение уровней IL-1 $\beta$  (на 15-е сутки) с их дальнейшим снижением до уровня исходных значений (рисунки 51 А,Б).

А.



Б.



**Рисунок 51 - Содержание IL-1 $\beta$  и MCP-1 в плазме крови самок крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. IL-1 $\beta$ ; Б. MCP-1. \*P < 0,05 по сравнению с контролем;  $^{\$}$ P < 0,05 по сравнению с исходным значением.

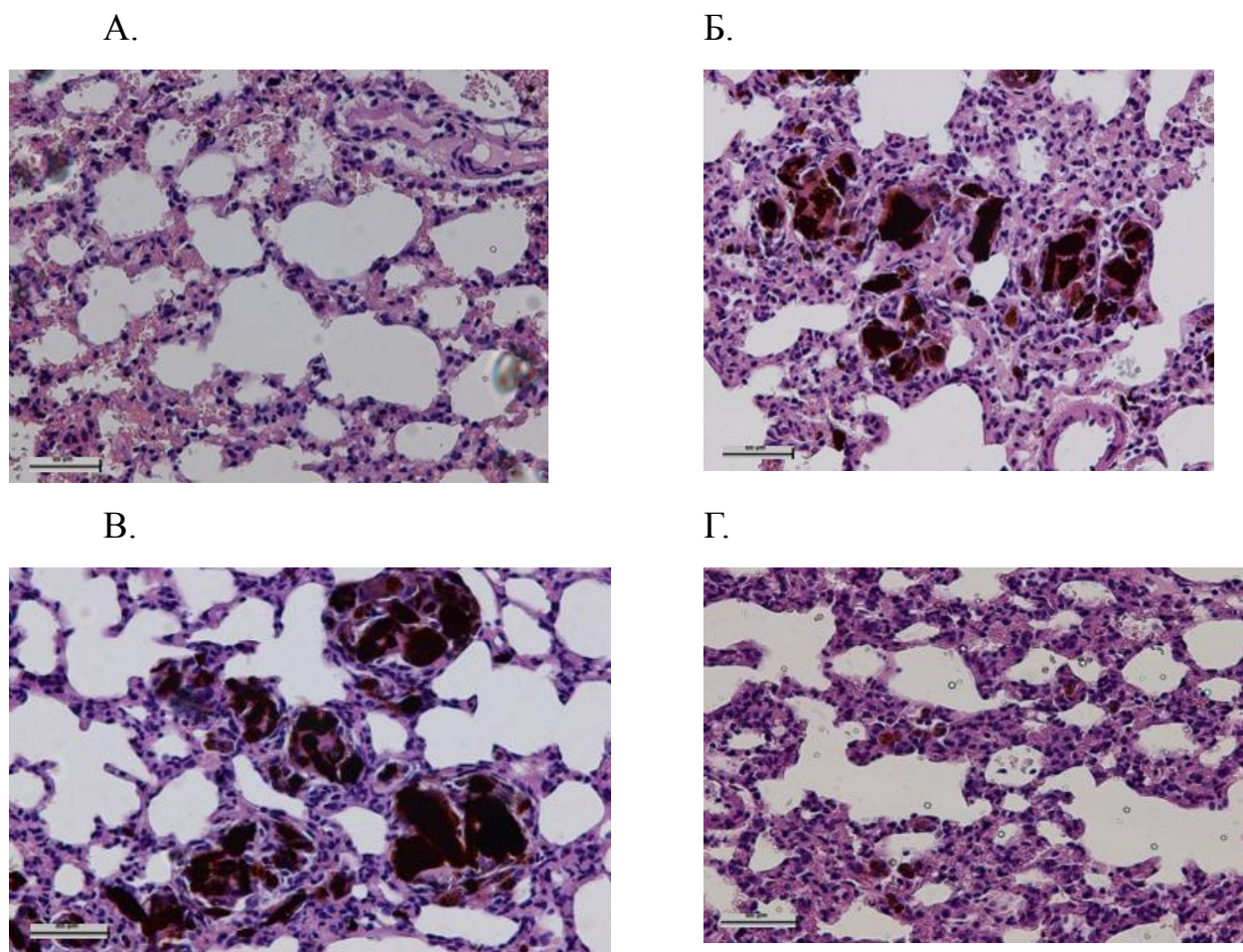
Повышение МСР-1 отмечалось исключительно на фоне введения крысам МНЧ2 (15-е сутки). К окончанию эксперимента данные показатели возвращались к исходным значениям.

На фоне многократного введения МНЧ1 и дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг изменений массовых коэффициентов отдельных органов животных (самок и самцов) не наблюдалось (во всех экспериментальных группах –  $p > 0,05$  по сравнению с контролем) (таблица 28).

В группе крыс с введением МНЧ1 в дозе 30,0 и 60,0 мг/кг в отдельных участках респираторного отдела наблюдались изменения паренхимы в виде депозитов из Перлс-позитивного материала, тампонирующих просвет микроциркуляторного русла межальвеолярных перегородок (рисунок 52 Б,В). Данные изменения представлены исключительно в группах с введением МНЧ1 и отсутствовали при введении МНЧ2 в дозе 10,0 мг/мл (рисунок 52 Г). В строме органов животных группы МНЧ2 отмечались единичные макрофаги, фиксирующие гранулы железа.

Данное влияние нельзя расценивать как специфическое токсическое влияние наночастиц. Данный эффект не связан с тропностью наночастиц с легким, а обусловлен нестабильностью наночастиц как лекарственной формы, вводимой внутривенно в организм животных.

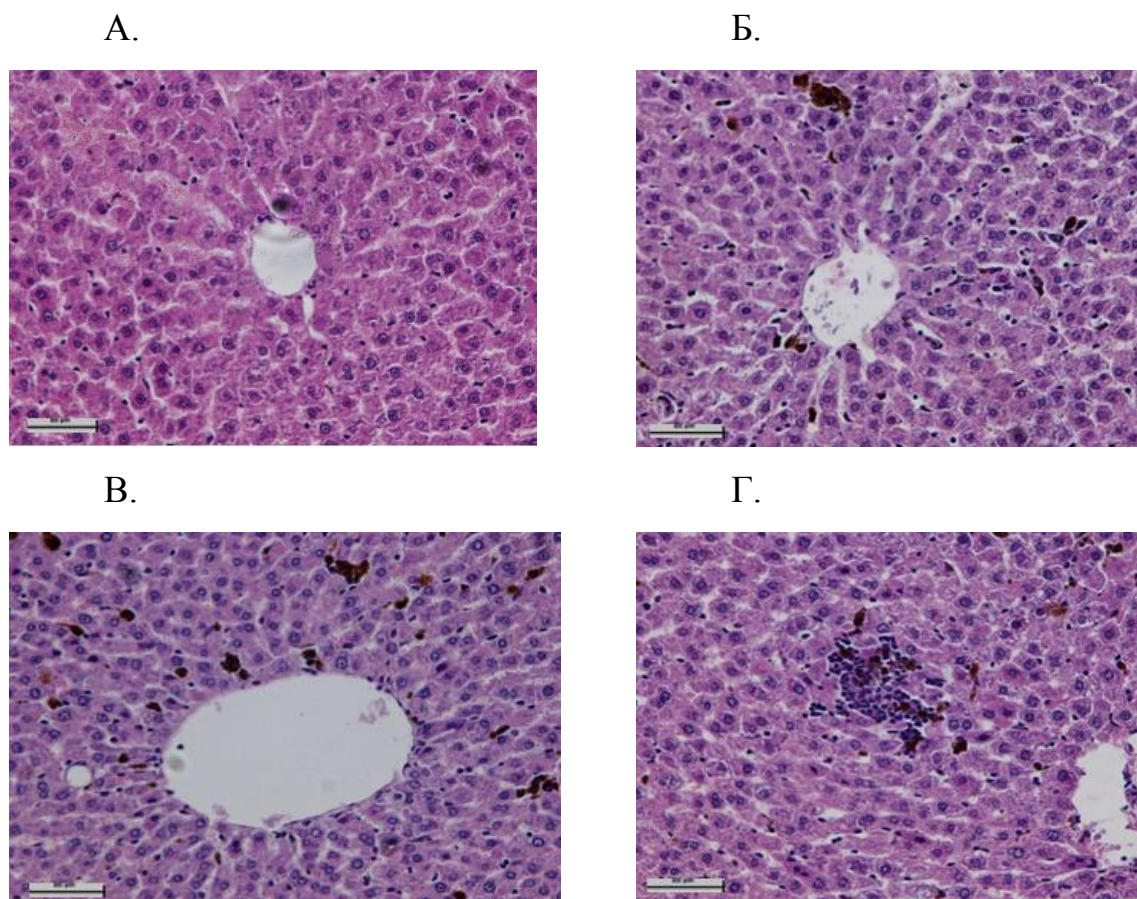
В образцах печени крыс групп МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 наблюдалась выраженная макрофагальная инфильтрация клетками Купфера в зоне печеночных балок и триад (рисунок 53 Б,В). Перлс-положительные клетки были наиболее представлены в группе МНЧ1-60,0.



**Рисунок 52 - Легкие крысы после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**  
*Примечание:* А. Контроль; Б. Наночастицы магнетита в дозе 30,0 мг/кг; В. Наночастицы магнетита в дозе 60,0 мг/кг; Г. Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. Окраска по Перлсу с докрасиванием гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$ .

Для образцов печени группы МНЧ2 было характерно иное поведение макрофагов, формирующих гранулемы из клеток Купфера, содержащих Перлс-положительный материал и не содержащих таковой (*рисунок 53 Г*).

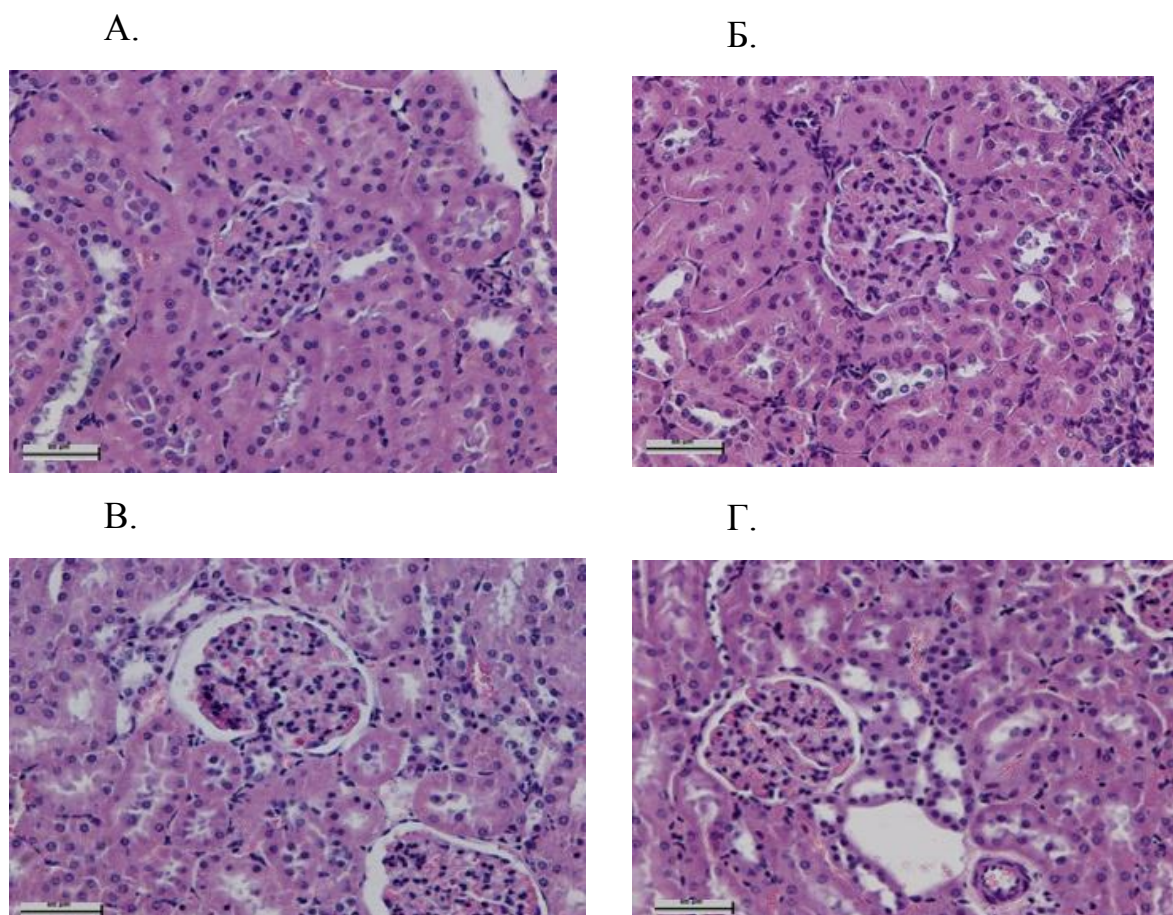




**Рисунок 53 - Печень крыс (самцы и самки) после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* А. Контроль; Б. Наночастицы магнетита в дозе 30,0 мг/кг; В. Наночастицы магнетита в дозе 60,0 мг/кг; Г. Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. Реакция Перлса с дополнительной окраской гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$ .

Структура почек крыс на фоне введения всех видов МНЧ не отличалась от контроля (*рисунок 54 А-Г*). В группе МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг у двух животных (самец и самка) обнаружено незначительное расширение просвета капсулы клубочка. В группе МНЧ2 (у одного животного – самец) наблюдалось расширение просвета дистальных извитых канальцев. Единичные мононуклеарные макрофаги наблюдались в органах животных всех испытываемых групп (самки и самцы).



**Рисунок 54 - Почка крыс (самцы и самки) после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

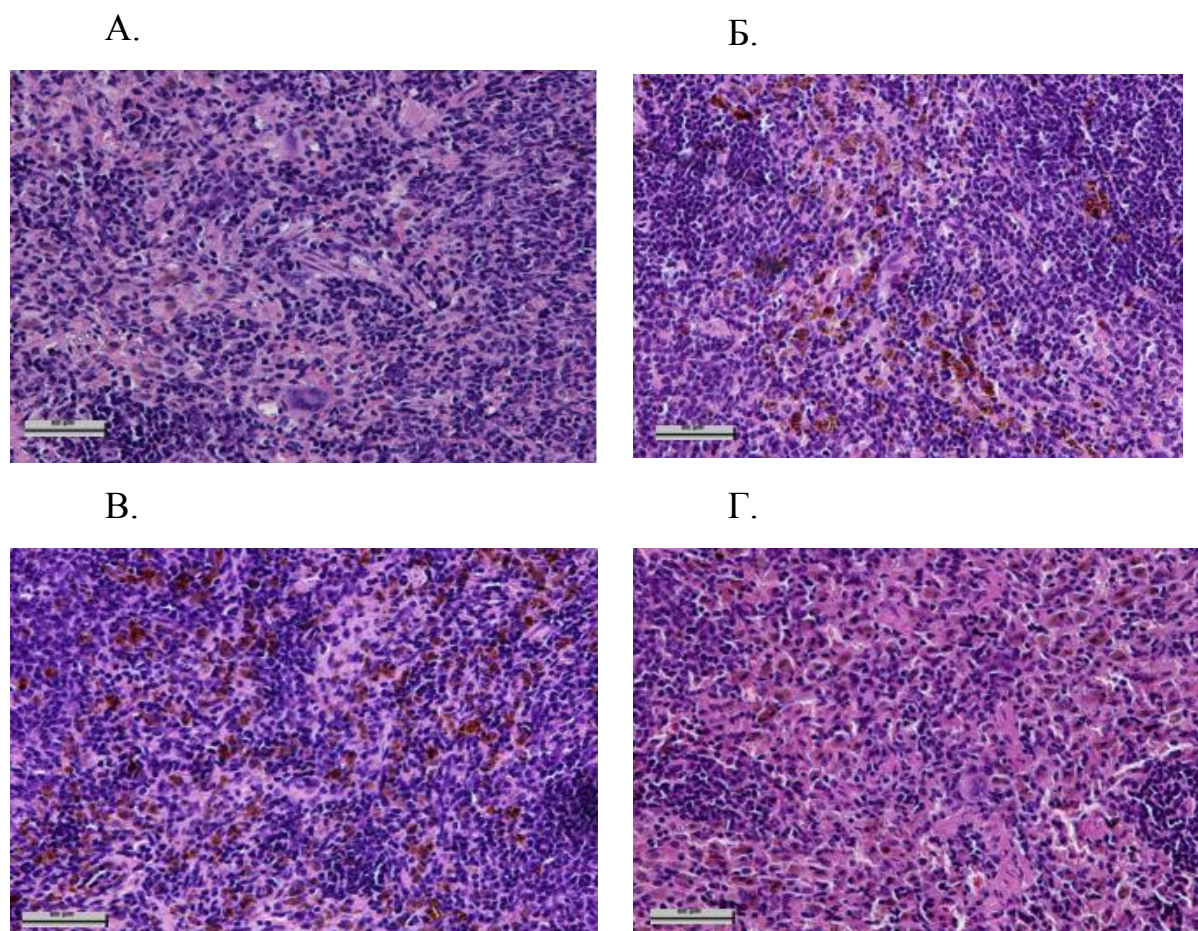
Примечание: А. Контроль; Б. Наночастицы магнетита в дозе 30,0 мг/кг; В. Наночастицы магнетита в дозе 60,0 мг/кг; Г. Композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. Реакция Перлса с дополнительной окраской гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$ .

**Таблица 28 - Массовые коэффициенты отдельных органов самцов и самок крыс после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

Показатель	Группа							
	ФР		МНЧ1-30,0		МНЧ1-60,0		МНЧ2-10,0	
	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6	Самцы n=6	Самки n=6
Головной мозг, %	0,48±0,05	0,78±0,10	0,53±0,04	0,74±0,06	0,56±0,03	0,74±0,10	0,55±0,04	0,82±0,10
Легкие, %	0,47±0,04	0,56±0,03	0,53±0,10	0,59±0,03	0,66±0,03	0,61±0,05	0,52±0,04	0,63±0,10
Сердце, %	0,27±0,20	0,36±0,03	0,26±0,04	0,33±0,07	0,29±0,02	0,36±0,04	0,30±0,06	0,33±0,05
Печень, %	2,89±0,03	3,13±0,05	3,01±0,07	3,51±0,07	3,06±0,03	3,10±0,10	3,23±0,04	3,13±0,10
Селезенка, %	0,21±0,05	0,26±0,20	0,18±0,04	0,26±0,06	0,20±0,04	0,25±0,05	0,22±0,05	0,26±0,07
Почки, пара, %	0,59±0,05	0,70±0,06	0,53±0,06	0,59±0,04	0,60±0,07	0,67±0,03	0,56±0,04	0,75±0,03

*Примечание:* ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг.

Характерным для всех групп являлось присутствие в селезенке Перлс-позитивных макрофагов, что являлось свидетельством фиксации ими введенного железа (*рисунок 55 А-Г*).



**Рисунок 55 - Селезенка крыс (самцы и самки) после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**  
*Примечание:* А. Контроль; ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. Реакция Перлса с дополнительной окраской гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$ .

Количественное скопление мононуклеарных макрофагов в органах крыс на фоне многократного введения МНЧ различалось в зависимости от вида наночастиц и их дозы (*рисунок 56 А,Б*).

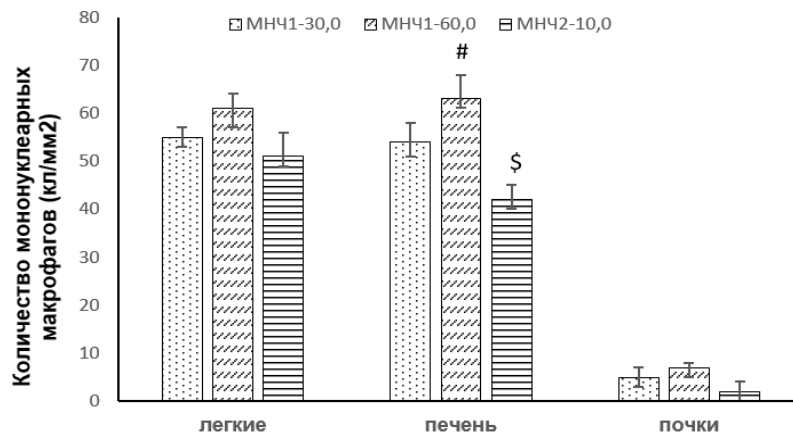
Реакция Перлса на гистологических препаратах легких, печени и почках самок и самцов крыс контрольных групп была отрицательной.

На 31-е сутки после многократного внутривенного введения крысам (самцам и самкам) МНЧ1 и МНЧ2 наблюдались депозиты железа в клетках системы мононуклеарных фагоцитов.

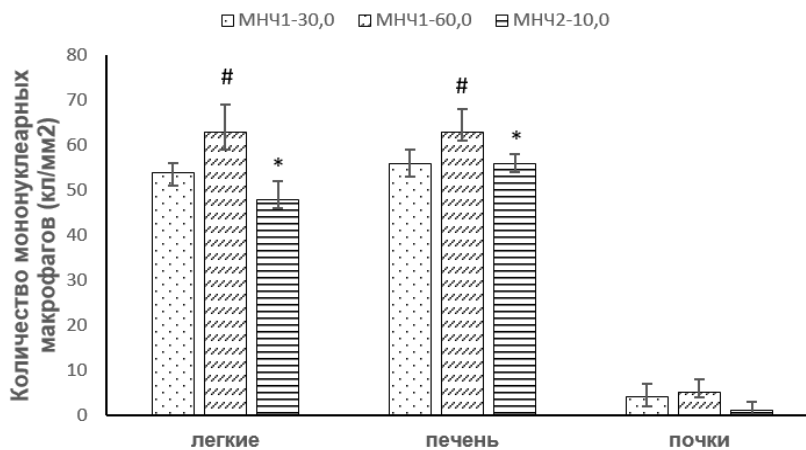
При этом введение обоих видов МНЧ приводило к различной степени накопления железа в клетках легких, печени и почек с различной степенью накопления. В ткани печени максимальное количество клеток наблюдалось при введении МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг, а минимальное – при введении МНЧ2. При этом в ткани легких самцов крыс на фоне введения всех видов МНЧ в используемых дозах число Перлс-положительных клеток не различалось ( $p > 0,05$  между группами). В свою очередь, единичность Перлс-позитивных клетки ( $p > 0,05$  между группами МНЧ1 и МНЧ2), обусловлено слабым развитием в данном органе системы мононуклеарных фагоцитов.

Таким образом, трехкратное внутривенное введение МНЧ2 в дозе 30,0 мг/кг обеспечивало 100% гибель животных (самок и самцов), в то время как в условиях ежедневного (в течение 7 суток) введения МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг гибели животных не наблюдалось. На фоне введения МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг гибель животных также отсутствовала. В связи с этим на данном этапе исследования производили сравнительное исследование биологических эффектов многократного введения различных доз МНЧ1 и МНЧ2 (30,0, 60,0 мг/кг и 10,0 мг/кг, соответственно).

А.



Б.



**Рисунок 56 - Количество мононуклеарных макрофагов в органах крыс после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц**

*Примечание:* МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10,0 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния в дозе 10,0 мг/кг. А. Самцы; Б. Самки. #P < 0,05 по сравнению с МЧ1-30,0; \$P < 0,05 по сравнению с МНЧ1-30,0 и МНЧ1-60,0 в этом же органе; \*P < 0,05 по сравнению с МНЧ1-60,0.

Многократное внутривенное ведение МНЧ1 в меньшей дозе (30,0 мг/кг) не вызывало у самок и самцов крыс изменения интегральных показателей развития животных, результатов гематологического и биохимического анализа крови, клинического анализа мочи, а также параметров свертывания крови, обеспечивая при этом снижение содержания жировой ткани, косвенно свидетельствующего о токсическом действии наночастиц. Кроме того, на 15-е

сутки после последнего введения наблюдалось повышение уровня IL-1 $\beta$ , вероятно, отражающего воспалительный ответ на введение наночастиц, проходящий к окончанию эксперимента (о чем свидетельствовало возвращение уровня данного показателя к исходным значениям). Незначительное гепатотоксическое действие в указанной дозе МНЧ1 не обуславливает при этом его отражения на системном уровне (о чем свидетельствуют результаты биохимического анализа, а также отсутствие изменений со стороны параметров свертывания крови).

Многократное внутривенное введение самцам и самкам крыс наночастиц магнетита (МНЧ1) в дозе 60,0 мг/кг и композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2) в дозе 10,0 мг/кг обуславливало схожие проявления системной токсичности. Так, введение МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг и МНЧ2 обуславливало равнозначное снижение содержания жира в организме животных, наличие признаков гепатотоксического действия наночастиц (биохимический анализ крови, гистологический анализ), воспалительной реакции в ответ на их многократное введение. При этом многократное внутривенное введение МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг не обеспечивало влияния на параметры свертывания крови, в то время как введение МНЧ2 вызывало гипокоагуляционный сдвиг.

Таким образом, однократное и многократное внутривенное введение МНЧ2 вызывало схожие по характеру нарушения физиологического состояния животных. Среди отличий в эффектах, оказываемых МНЧ1 при указанных режимах введения, можно выделить отсутствие при многократном введении у данного вида наночастиц влияния на параметры гемостаза.

### **3.8 - Гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях *in vivo* и *ex vivo* при наличии внешнего магнитного поля**

Стабильность композитов наночастиц (способность образовывать устойчивую коллоидную систему в водных растворах и других

биосовместимых растворителях) является одним из определяющих факторов их успешного использования в биомедицине. При увеличении ионной силы раствора, например, в случае магнитных наночастиц, находящихся в ФР, агрегативная устойчивость может нарушаться по причине уменьшения толщины двойного электрического слоя. Кроме того, воздействие постоянного магнитного поля на такие магнитные наночастицы может приводить к формированию агрегатов, ориентированных вдоль силовых линий магнитного поля, и потере седиментационной устойчивости раствора [330].

Исследование реакции организма на введение магнитных наночастиц, синтезированных различными способами, является необходимым этапом скрининга их безопасности, а также является основополагающим в дальнейшем решении использовать наноконструкции на их основе в качестве средства адресной доставки фармакологических препаратов в миокард. Ранние изменения гемодинамических показателей при системном введении магнитных наночастиц в различных условиях (при наличии/отсутствии внешнего магнитного поля) могут служить индикатором их биосовместимости и безопасности.

В связи с этим, отдельной задачей в рамках определения возможности использования наночастиц в качестве средства адресной доставки лекарственных препаратов явилось исследование показателей центральной гемодинамики и органной микроциркуляции при однократном внутривенном введении немодифицированных магнитных наночастиц, полученных различными способами, при наличии/отсутствии внешнего магнитного поля.

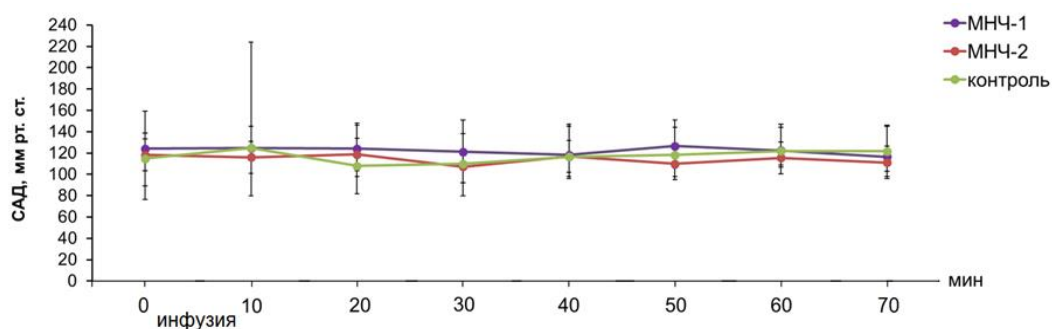
Эксперимент *in vivo* был выполнен на крысах, которым осуществляли внутривенное введение МНЧ в условиях воздействия в области сердца внешним магнитом. Исходно, в процессе введения 1,4 мг/2 мл МНЧ, а также в течение часа после введения осуществляли регистрацию параметров системной гемодинамики (систолическое артериальное давление, САД и частоту сердечных сокращений, ЧСС) и органной микроциркуляции с помощью метода лазерной доплеровской флуометрии (ЛДФ).



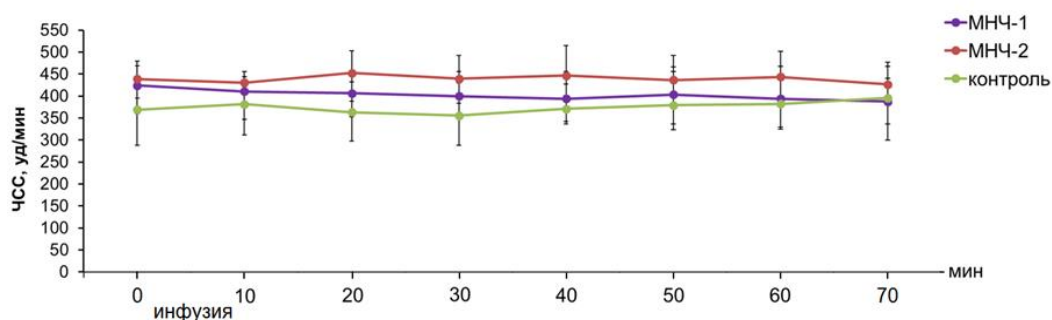
Исходные значения САД и ЧСС во всех экспериментальных группах статистически не различались ( $p > 0,05$ ). В ходе эксперимента САД и ЧСС в контрольной группе достоверно не изменялись относительно исходного уровня. На момент окончания эксперимента значения САД и ЧСС в контрольной группе составили: 121,6 [103,0;146,0] мм рт.ст. и 396,0 [336,0;468,0] уд/мин, соответственно.

Внутривенное введение МНЧ1 и МНЧ2 при отсутствии воздействия внешнего магнитного поля не изменяло параметры САД и ЧСС (рисунки 57).

А.



Б.



**Рисунок 57 - Динамика показателей центральной гемодинамики крыс при однократном внутривенном введении немодифицированных магнитных наночастиц различного качественного состава в условиях отсутствия воздействия внешнего магнитного поля**

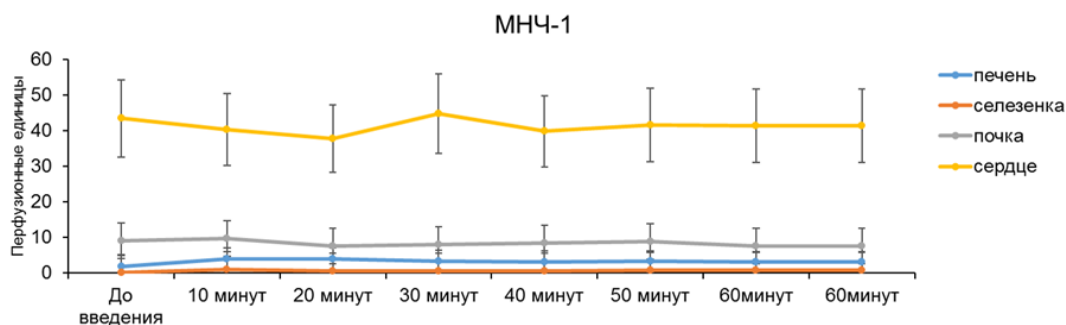
*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. САД; Б. ЧСС.

В условиях введения МНЧ1 на момент окончания эксперимента

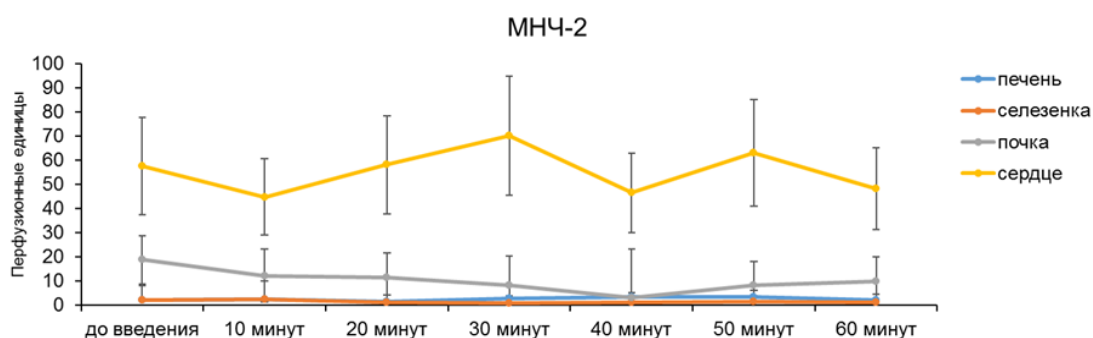
значения САД и ЧСС в данной группе составили 116,6 [98,0;145,0] мм рт ст. и 387,8 [300,0;440,0] уд/мин, соответственно, ( $p > 0,05$  по сравнению с исходными значениями, с группой контроля). На фоне введения МНЧ2 значения САД и ЧСС составили 111,2 [81,0;130,0] мм рт ст. и 426,8 [336,0;477,0] уд/мин, ( $p > 0,05$  по сравнению с исходными значениями, с группами контроля и МНЧ1).

На фоне внутривенного введения МНЧ1 при отсутствии магнитного поля в динамике эксперимента изменений со стороны органной перфузии не наблюдалось (рисунок 58).

А.



Б.



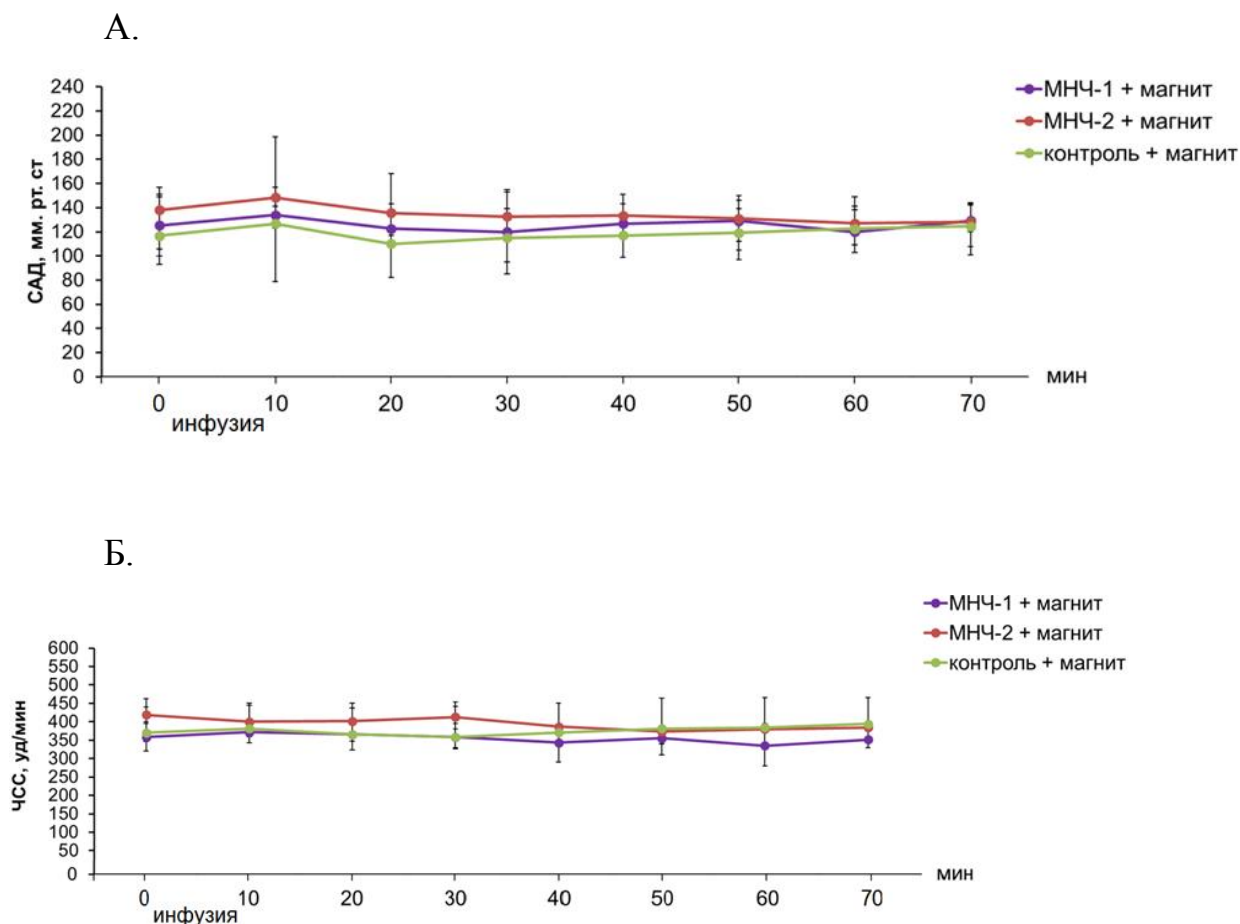
**Рисунок 58 - Динамика уровней перфузии отдельных органов крыс при однократном внутривенном введении немодифицированных магнитных наночастиц различного качественного состава в условиях отсутствия воздействия внешнего магнитного поля**

*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. МНЧ1; Б. МНЧ2.

При внутривенном введении МНЧ2 у отдельных животных на

различных временных этапах эксперимента на уровне различных органов наблюдались незначительные проходящие изменения микроциркуляции. Вероятно, в основе данных изменений лежит образование незначительных по размеру конгломератов МНЧ, характеризующихся неустойчивостью во времени и распадающихся самопроизвольно или под воздействием тока крови.

Влияние внутривенного введения МНЧ1 и МНЧ2 в условиях воздействия внешним магнитным было аналогично таковому при его отсутствии. Параметры САД и ЧСС в условиях введения МНЧ1 и МНЧ2 в присутствии внешнего магнитного поля оставались на уровне контрольных значений (рисунок 59).

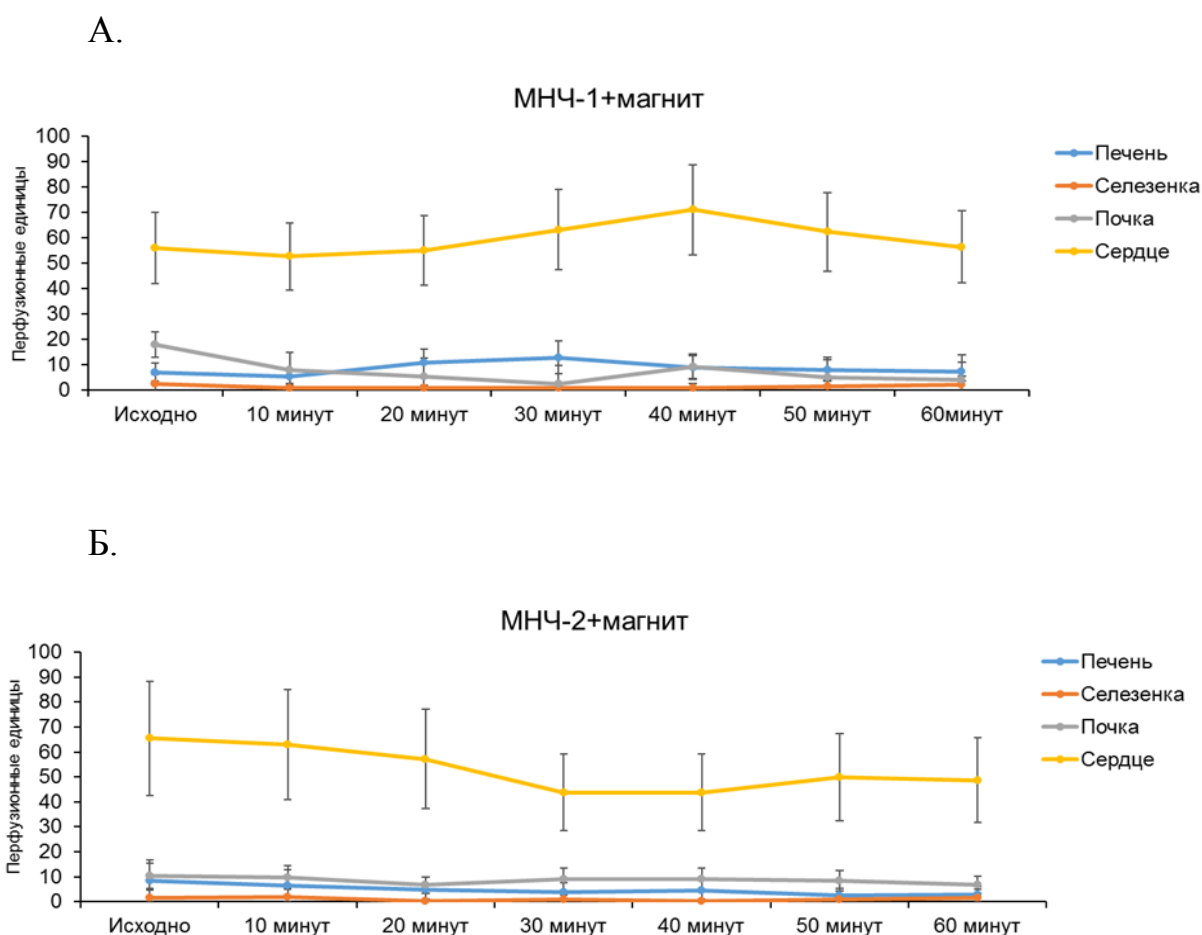


**Рисунок 59 - Динамика показателей центральной гемодинамики крыс при однократном внутривенном введении немодифицированных магнитных наночастиц различного качественного состава в условиях воздействия внешнего магнитного поля**

*Примечание:* А. САД; Б. ЧСС.

На фоне введения МНЧ1 на момент окончания эксперимента САД и ЧСС составили 129,3 [120,0;142,0] мм рт ст. и 351,7 [330,0;375,0] уд/мин, соответственно ( $p > 0,05$  по сравнению с исходными значениями, с группой контроля). На фоне введения МНЧ2 показатели центральной гемодинамики составили 124,6 [101,0;143,0] мм рт ст. (САД) и 393,8 [334,0;465,0] уд/мин (ЧСС), ( $p > 0,05$  по сравнению с исходными значениями, с группой контроля).

В условиях воздействия магнитом на фоне введения МНЧ1 не наблюдалось значимых изменений со стороны органной перфузии (рисунк 60).



**Рисунок 60 - Динамика уровней перфузии отдельных органов крыс при однократном внутривенном введении немодифицированных магнитных наночастиц различного качественного состава в условиях воздействия внешнего магнитного поля**

*Примечание:* А. МНЧ1; Б. МНЧ2.

Однако как при введении МНЧ2 в ходе эксперимента наблюдалась статистически недостоверная тенденция к незначительному снижению микроциркуляции в миокарде, что, предположительно, обусловлено образованием под воздействием магнитного поля небольших конгломератов МНЧ, ориентированных вдоль силовых линий магнитного поля [330] и характеризующихся неустойчивостью во времени, на что указывает временный характер изменения микроциркуляции. Отсутствие изменений микроциркуляции в печени, селезенке и почках в данном случае обусловлено преимущественным накоплением МНЧ в миокарде в условиях воздействия внешнего магнитного поля на соответствующую область. Остальные параметры органной перфузии не изменялись.

Результаты, полученные в рамках исследования центральной гемодинамики и органной микроциркуляции в условиях воздействия магнитных наночастиц, введенных при воздействии внешнего магнитного поля, обуславливают отдельный интерес в изучении безопасности селективного накопления наночастиц в органах в условиях магнитоуправляемой доставки. Удобной моделью для решения данной задачи является изолированное сердце, перфузируемое методом Лангендорфа, основным преимуществом использования которой является возможность определения четкой взаимосвязи между изменениями функционирования миокарда и оказываемым воздействием (поскольку в данной модели миокард выведен из-под влияния регуляторных систем целого организма), а также возможность при этом оценки эффективности накопления вводимых в миокард агентов.

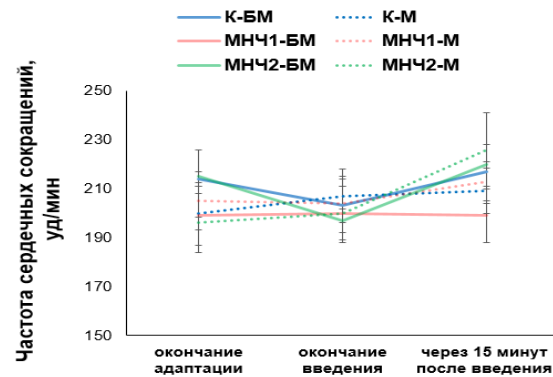
Исследование проводили на изолированных сердцах крыс, перфузию которых осуществляли методом Лангендорфа, при котором подача перфузионного раствора осуществляется ретроградно через аорту. Для создания внешнего магнитного поля использовали соленоид, воздействие магнитным полем осуществляли в течение 5 минут с момента начала интракоронарного введения 0,7 мг/1мл МНЧ1 или МНЧ2. На момент

окончания адаптации, на момент окончания введения МНЧ и через 10 минут после окончания введения оценивали параметры сократительной активности сердец: СД, конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.), давление, развиваемое левым желудочком (разница между систолическим и диастолическим давлениями, ДРЛЖ, мм рт. ст.), ЧСС. На момент окончания адаптации и на этапе окончания эксперимента оценивали коронарный проток (КП, мл/мин). После окончания эксперимента определяли количество удержанных в сердце под действием магнитного поля наночастиц.

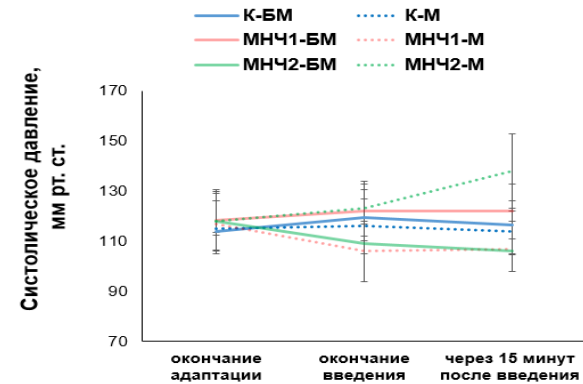
Исходные показатели сократительной активности изолированных сердец не различались во всех экспериментальных группах независимо от наличия или отсутствия магнитного поля. В контрольных группах с наличием магнита (К-М) и без его воздействия (К-БМ) сократительная активность миокарда не изменялась в динамике всего эксперимента (*рисунок 61, рисунок 62*).

Введение МНЧ при отсутствии магнитного поля не влияло на параметры сократительной активности сердец. Однако введение МНЧ1 и МНЧ2 в условиях воздействия внешним магнитным полем характеризовалось схожим влиянием на сократительную активность миокарда, проявляющимся в виде снижения коронарного протока и повышения конечно-диастолического давления.

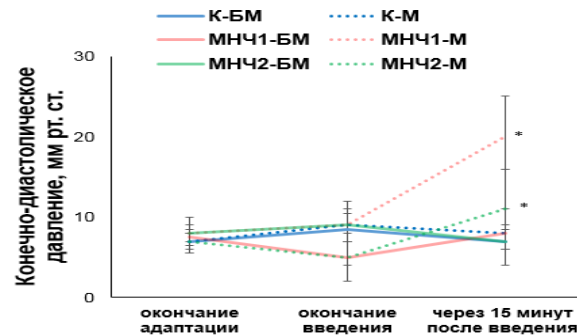
А.



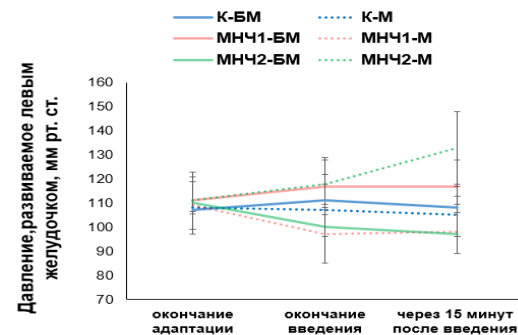
Б.



В.

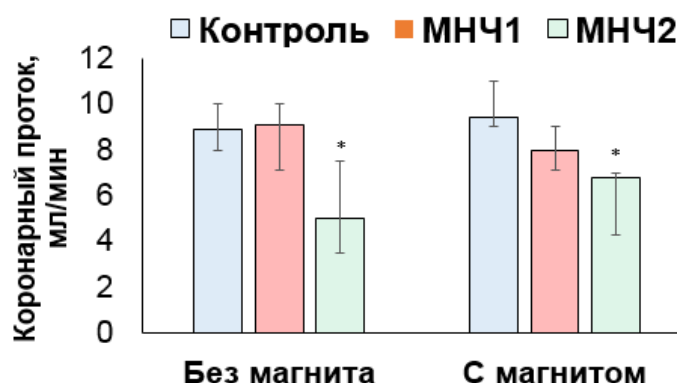


Г.



**Рисунок 61 - Параметры функционального состояния сократительной функции миокарда после введения немодифицированных магнитных наночастиц различного качественного состава, в условиях наличия внешнего магнитного поля**

*Примечание:* К-БМ – группа контроля без использования магнита; К-М – группа контроля с использованием магнита; МНЧ1-БМ – группа с введением наночастиц магнетита без использования магнита; МНЧ1-М – группа с введением наночастиц магнетита с использованием магнита; МНЧ2-БМ – группа с введением композитных наночастиц без использования магнита; МНЧ2-М – группа с введением композитных наночастиц с оболочкой из полилактида с использованием магнита. А. Частота сердечных сокращений; Б. Систолическое давление; В. Конечно-диастолическое давление; Г. Давление развиваемое левым желудочком; Д. Коронарный проток. \* $P < 0,05$  относительно контроля.



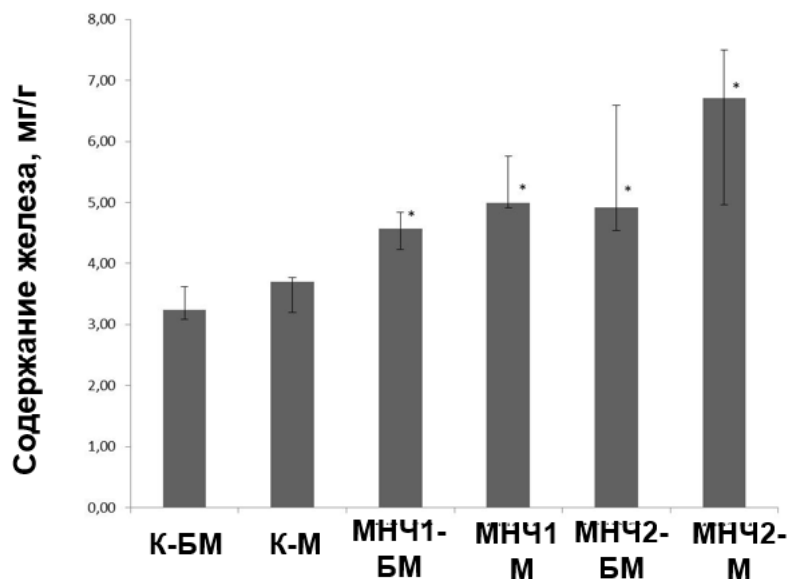
**Рисунок 62 – Коронарный проток изолированных сердец после введения немодифицированных магнитных наночастиц различного качественного состава, в условиях наличия внешнего магнитного поля**  
*Примечание:* МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния.

Введение МНЧ1 и МНЧ2 в изолированное сердце крысы в условиях наличия/отсутствия внешнего магнитного поля, характеризовалось их равнозначным накоплением в ткани сердца, о чем свидетельствовал достоверно более высокий (относительно контрольного) уровень железа в миокарде на момент окончания эксперимента (*рисунок 63*).

В группах с введением МНЧ1 (в условиях воздействия и отсутствия воздействия внешним магнитным полем, МНЧ1-М и МНЧ1-БМ, соответственно) содержание железа в тканях изолированных сердец составило 4,6 [4, 2;4,8] мг/г (МНЧ1-М) и 5,0 [4,9;5,8] мг/г (МНЧ1-БМ),  $p > 0,05$  между группами). Содержание экзогенного железа в тканях сердец увеличилось относительно контроля на 30% на фоне введения МНЧ при воздействии магнитного поля, так и при его отсутствии ( $p < 0,05$ ).

При введении МНЧ2 в условиях отсутствия и воздействия внешнего магнитного поля (МНЧ2-БМ и МНЧ2-М, соответственно) содержание железа в тканях сердец составило 4,9 [4,5; 7,0] мг/г и 6,7 [5,0; 7,5] мг/г, соответственно ( $p > 0,05$  между группами).





**Рисунок 63 - Содержание железа в изолированных сердцах крыс после введения немодифицированных магнитных наночастиц в условиях наличия внешнего магнитного поля (по отношению к сухой массе органа)**

*Примечание:* К-БМ – группа контроля без использования магнита; К-М – группа контроля с использованием магнита; МНЧ1-БМ – группа с введением наночастиц магнетита без использования магнита; МНЧ1-М – группа с введением наночастиц магнетита с использованием магнита; МНЧ2-БМ – группа с введением композитных наночастиц без использования магнита; МНЧ2-М – группа с введением композитных наночастиц с оболочкой из полилактида с использованием магнита. \* $P < 0,05$  относительно контроля.

Содержание экзогенного железа в тканях сердец увеличилось на 40% относительно контроля на фоне введения МНЧ при воздействии магнитного поля, так и при его отсутствии ( $p < 0,05$ ).

Известно, что ключевыми факторами, определяющими возможность захвата и удержания магнитной силой МНЧ, являются параметры самих МНЧ, величины вектора магнитной индукции и градиента вектора магнитной индукции [98]. В условиях кратковременного (острого) эксперимента вышеописанное накопление МНЧ в миокарде влечет изменение параметров сократительной активности сердец.

Выявленное ухудшение функционирования миокарда в условиях воздействия МНЧ1 и МНЧ2 при наличии магнитного поля можно объяснить

снижением агрегационной устойчивости наночастиц при воздействии магнитного поля и частичной закупоркой агрегатами наночастиц просвета сосудов. Об этом свидетельствует снижение коронарного протока, отражающего количество перфузируемой жидкости, проходящей через коронарные сосуды изолированного сердца в единицу времени, что способствовало снижению сократительной активности миокарда. Можно предполагать, что при отсутствии магнитного поля агрегаты МНЧ2 также образуются, но, вероятно, меньшего размера, о чем свидетельствуют неизменные параметры сократительной активности. В основе снижения сократительной функции миокарда в условиях воздействия МНЧ могут лежать также иные механизмы, не связанные с образованием агрегатов наночастиц (например, кальцийзависимые реакции [245]).

Таким образом, наличие магнитного поля может изменять характер поведения МНЧ в условиях *ex vivo*. При этом, несмотря на выявленные изменения сократительной активности изолированных сердец в условиях воздействия МНЧ, их внутривенное введение крысам в условиях наличия магнитного поля не оказывает значимого влияния на системную гемодинамику и органную микроциркуляцию.

Для обоснования возможности использования наночастиц магнетита и композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния в качестве средства адресной доставки лекарств, а также для выбора перспективного кандидата для дальнейшей разработки были проведены серии экспериментов, перечень которых был сформирован, исходя из возможных токсикологических эффектов наночастиц, направленных на:

- исследование гемосовместимости указанного вида наночастиц (с оценкой их влияния на агрегативную устойчивость эритроцитов, а также гемолитического потенциала наночастиц);

- исследование влияния наночастиц на функциональную активность эндотелия при их внутривенном введении (с оценкой влияния наночастиц на параметры сокращения и расслабления сосудов);

- оценка дозозависимых эффектов наночастиц при их однократном и многократном внутривенном введении крысам (с исследованием широкого спектра оценочных критериев: интегральных показателей здоровья животных, гематологического и биохимического анализа крови, клинического анализа мочи, ИФА-анализа с определением уровня цитокинов, а также гистологического анализа отдельных органов);

- исследование влияния внутривенного введения наночастиц при наличии/отсутствии внешнего магнитного поля на показатели центральной гемодинамики и органной микроциркуляции крыс;

- исследование влияния наночастиц на функционирование изолированного сердца крысы при наличии внешнего магнитного поля.

Отдельными задачами в рамках данного раздела явились: исследование динамики органного распределения наночастиц при их внутривенном введении (с целью определения возможных мишеней воздействия наночастиц при их внутривенном введении), а также исследование формирования белкового слоя на поверхности наночастиц.

В целом, суммируя данные о влиянии МНЧ, имеющих различный качественный состав, на физиологические параметры, можно резюмировать, что воздействие МНЧ1 приводило к меньшей степени нарушения физиологических функций (*таблица 29*).

**Таблица 29 - Выявленные патофизиологические эффекты немодифицированных магнитных наночастиц**

Выявленный эффект	МНЧ1	МНЧ2
Гемолитическая активность	+	+++
Влияние на функциональную активность сосудов	+ при этом не вызывают нарушений системной гемодинамики	Не влияет
Гибель крыс при одно- многократном введении МНЧ	+	+++
Гепатотоксическое действие при одно- многократном введении	+	++
Гипокоагуляционный эффект	+ при однократном введении	+ при одно- и многократном введении
Влияние на микроциркуляцию в условиях воздействия магнитным полем	Не влияет	+

В связи с этим, в дальнейших сериях экспериментов с модификацией поверхности наночастиц посредством нанесения оболочек были использованы наночастицы магнетита (МНЧ1). Нанесение оболочек на поверхность наночастиц является широко используемым подходом, применяемым с целью улучшения физико-химических свойств наночастиц, предотвращения их агрегации и окисления, повышения их биосовместимости [3, 21, 307]. Кроме того, нанесение оболочки может быть использовано для дальнейшей функционализации МНЧ с присоединением фармакологических агентов к их поверхности или инкорпорирования таковых в состав самой оболочки [142, 244, 309]. Выбор оболочек основывался на относительной изученности данных полимеров, их биосовместимости и способности к биodeградации, позволяющих использовать их в медицинских целях.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 3-Й ГЛАВЫ**

*Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science*

1. Изучение влияния однократного и многократного внутривенного введения магнитных наночастиц на основе оксида железа на показатели свёртывающей системы крови крыс / Я.Г. Торопова, Н.В. Бельская, Ю.П. Бельский, Д.В. Королев, К.Г. Гареев // Трансляционная медицина. 2020. Т. 7, № 6. С. 82-92 (ИФ РИНЦ-0.382).

2. Изучение эффективности и безопасности магнитоуправляемой доставки магнитных наночастиц на модели изолированного сердца крысы / Я.Г. Торопова, В.Д. Богушевская, В.И. Мишанин, Д.В. Королев, К.Г. Гареев // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105, № 3. С. 386-398 (ИФ РИНЦ-0.557).

3. Изучение гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема *in vitro* / Я.Г. Торопова, Н.А. Печникова, И.А. Зелинская, Д.В. Королев, К.Г. Гареев, А.С. Маркитантова, В.Д. Богушевская, А.В. Поволоцкая, А.А. Маньшина / Бюллетень сибирской медицины. 2018. Т. 17, № 3. С. 157-167 (ИФ РИНЦ-0.644, Scopus, WoS).

4. Влияние наночастиц магнетита и коллоидных частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$  на функциональное состояние эндотелия при внутривенном введении крысам / Я.Г. Торопова, И.А. Зелинская, А.С. Маркитантова, Н.А. Печникова, С.Г. Чефу, Д.В. Королев, К.Г. Гареев, А.В. Поволоцкая, А.А. Маньшина. / Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017. Т. 103, № 12. С. 1416-1424 (ИФ РИНЦ-0.537).

5. Динамика показателей периферической крови крыс в эксперименте с введением магнитных композитов на основе наноразмерных частиц оксида железа / Я.Г. Торопова, Д.В. Королев, М.В. Афонин, К.Г. Гареев, Н.А. Печникова, А.А. Матвиенко, В.Д. Богушевская // Биотехносфера. - 2016.

- № 2 (44). - С. 49-54 (ИФ РИНЦ-0.316).

6. Динамика естественного биораспределения магнитных наночастиц, полученных различными способами, при их однократном введении крысам стока Wistar / Д.В. Королев, Е.В. Захарова, Н.В. Евреинова, Я.Г. Торопова, Н.А. Печникова, Е.С. Сергиенко, К.Г. Гареев // Трансляционная медицина. 2016. Т. 3, № 4. С. 56-65 (ИФ РИНЦ-0.190).

7. Центральная гемодинамика и органная микроциркуляция в различных органах у крыс при однократном внутривенном введении магнитных наночастиц / Я.Г. Торопова, Н.А. Печникова, Д.В. Королев, К.Г. Гареев, И.А. Зелинская, С.М. Минасян // Трансляционная медицина. 2016. Т. 3, № 4. С. 72-81 (ИФ РИНЦ-0.190).

8. Исследование токсичности магнитных наночастиц на основе оксида железа на культуре эндотелиальных клеток человека / А.С. Головкин, А.Б. Малашичева, Я.Г. Торопова, Д.В. Королев, К.Г. Гареев, М.В. Афонин. // Трансляционная медицина. 2015. № s2. С. 23-24 (ИФ РИНЦ-0.280).

9. In Vitro toxicity of  $Fe_mO_n$ ,  $Fe_mO_n-SiO_2$  composite, and  $SiO_2-Fe_mO_n$  core-shell magnetic nanoparticles / Y.G. Toropova, A.S. Golovkin, A.V. Malashicheva, D.V. Korolev, A.N. Gorshkov, K.G. Gareev, M.V. Afonin, M.M. Galagudza. // International Journal of Nanomedicine. -2017. - Т. 12. - Р. 593-603. doi: [10.2147/IJN.S122580](https://doi.org/10.2147/IJN.S122580) (Scopus).

*Публикации в других изданиях*

10. Глава: Магнитоуправляемая доставка лекарств в миокард / Я.Г. Торопова, Д.В. Королев, М.В. Афонин, К.Г. Гареев, А.С. Головкин, А.Б. Малашичева, Г.Б. Белостоцкая, М.М. Галагудза // Трансляционная медицина. Санкт-Петербург, 2015. - С. 156-164.

11. Влияние внутривенного введения крысам магнитных наночастиц на функциональное состояние эндотелия / М.Н. Горшкова, Д.С. Моторина, И.А. Зелинская, Я.Г. Торопова // Трансляционная медицина: Алмазовский молодежный медицинский форум — 2019. (16–18 мая 2019 г). Санкт-Петербург, 2019. С. 456.

12. Изучение динамики генерации активных форм кислорода в цельной крови при добавлении магнитных наночастиц / А.А. Матвиенко, Н.А. Печникова, А.С. Маркитантова, Я.Г. Торопова / Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии-2017: сб. материалов XXIII Всерос. конф. молодых учёных с междунар. участием (13-14 апр. 2017 г). Санкт-Петербург, 2017. С. 135.

13. Хемилюминесцентный анализ кинетики генерации активных форм кислорода клетками цельной крови при их взаимодействии с магнитными наночастицами / А.С. Маркитантова, Я.Г. Торопова // Современные медицинские исследования-2016: IV Международная конференция (Кемерово, 17 сент. 2016 г). Кемерово, 2016. С. 144-149.

14. Изучение гемодинамических показателей у крыс при системном введении магнитных композитов на основе наноразмерных частиц железа в условиях воздействия внешнего магнитного поля / А.А. Матвиенко, Н.А. Печникова, Я.Г. Торопова // Актуальные проблемы патофизиологии-2016: сб. материалов XXII Всерос. конф. молодых учёных с междунар. участием (Санкт-Петербург, 7-8 апреля 2016 г). Санкт-Петербург, 2016. С. 51.

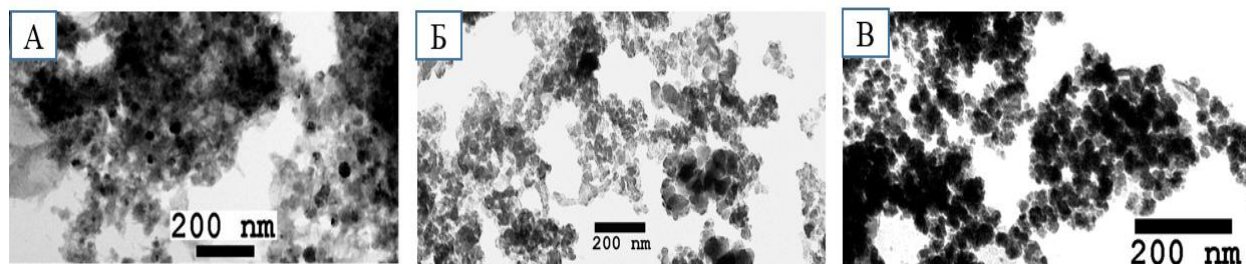
15. The Study on Biological Distribution of Magnetic Nanoparticles during Their Single Intravenous Administration to Rats on the Quantitative Iron Content: (poster) / D.V. Korolev, E.V. Zakharova, N.V. Evreinova, Ya.G. Toropova, N.A. Pechnikova, K. G. Gareev // OPEN 2016: Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures: 3rd International School and Conference Saint Petersburg (Saint Petersburg, March 28 – 30, 2016). Saint Petersburg, 2016.

16. Changes in the component composition of the rat body after single and multiple intravenous administration of iron oxide magnetic nanoparticles synthesized by different methods: (poster) / M. Gorshkova, D. Motorina, E. Podyacheva, D. Korolev, Ya. Toropova // Future Physiology-2021. Online. 2021. April 19-22.

## ГЛАВА 4 – ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПОЛИМЕРНЫМИ ОБОЛОЧКАМИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА

### 4.1 - Физико-химические свойства магнитных наночастиц магнетита с различными оболочками

По данным электронной микроскопии (*рисунок 64*) все виды исследуемых МНЧ характеризуются сферической формой. МНЧ с оболочкой из альбумина и полилактоида обладают близким к нулю электрокинетическим потенциалом (*таблица 30*), тогда как МНЧ с оболочкой из полисахарида характеризуется значительным отрицательным  $\zeta$ -потенциалом, что, вероятно, обусловлено наличием значительного количества концевых карбоксильных групп, которые образовались в результате синтеза полисахарида из глюкозы.



#### **Рисунок 64- Изображения модифицированных магнитных наночастиц, полученных с помощью электронной микроскопии**

*Примечание:* А. Наночастицы магнетита с оболочкой из полиэфира молочной кислоты (МНЧ+полилактоид); Б. Наночастицы магнетита с оболочкой из поликонденсированной глюкозы (МНЧ+полисахарид); В. Наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина (МНЧ+альбумин).



Максимальным гидродинамическим размером обладали МНЧ+альбумин, тогда как размер МНЧ+полисахарид был значительно меньше по сравнению с таковым в образцах МНЧ+полилактид.

**Таблица 30 - Средний гидродинамический радиус и электрокинетический потенциал образцов наночастиц, покрытых различными оболочками**

Характеристика/образец	МНЧ+полилактид	МНЧ+полисахарид	МНЧ+альбумин
Гидродинамический радиус, нм	122±38*	66±19	192±58
Дзета-потенциал, мВ	-0,1±2,7	-21,4±0,9	4,0±2,2
Форма	Сферическая	Сферическая	Сферическая

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. \*P < 0,05 по сравнению с МНЧ+полисахарид.

#### **4.2 - Влияние однократного внутривенного введения крысам модифицированных различными органическими полимерными оболочками магнитных наночастиц оксида железа на морфофункциональное состояние сосудов**

Эксперименты проводили на изолированных сосудах брыжейки, полученных от крыс с внутривенным введением МНЧ (1,4 мг в объеме 2 мл), покрытых различными оболочками. Через 1 час после введения МНЧ производили оценку сократительной и релаксационной способности сосудов, оценивали плазменный уровень оксида азота (NO), как косвенный критерий сохранности регуляторной функции эндотелия в условиях воздействия МНЧ, и изучали морфологические изменения сосудов.

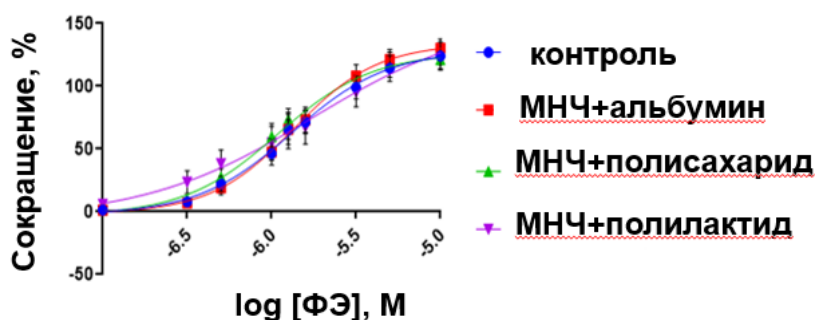
Однократное внутривенное введение МНЧ+полилактид и МНЧ+альбумин не обеспечивало изменения релаксации артериальных сосудов (*рисунок 65, таблица 31*).

**Таблица 31 - Значения логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа LogEC<sub>50</sub> и максимальной величины ответа E<sub>max</sub> в группах с введением модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц**

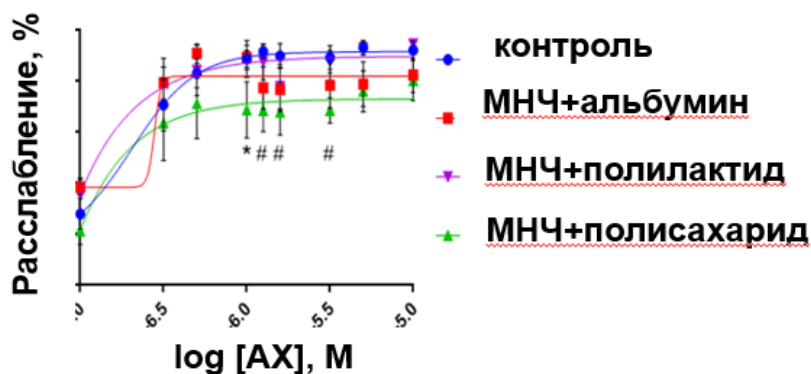
Объект исследования	Агонист/показатель			
	ФЭ		АХ	
	log, EC <sub>50</sub> , M	E <sub>max</sub> , %	log, EC <sub>50</sub> , M	E <sub>max</sub> , %
Контроль	-5,88±0,07	124,02±11,21	-6,69±0,05	93,19±2,66
МНЧ+альбумин	-5,87±0,056	130,39±7,13	-6,94±0,15	82,45±6,76
МНЧ+полисахарид	-5,96±0,06	121,17±7,37	-6,72±0,14	80,26±7,93*
МНЧ+полилактид	-5,76±0,28	124,41±7,58	-6,82±0,08	94,67±1,92

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. ФЭ – фенилэфрин; АХ – ацетилхолин. \* P < 0,05 по сравнению с контролем.

А.



Б.



**Рисунок 65 - Кумулятивная кривая «концентрация-ответ»**

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. А. Ответ на фенилэфрин; Б. Ответ на ацетилхолин. #P < 0,05 Контроль по сравнению с МНЧ+полисахарид; \*P < 0,05 МНЧ+альбумин по сравнению с МНЧ+полисахарид.

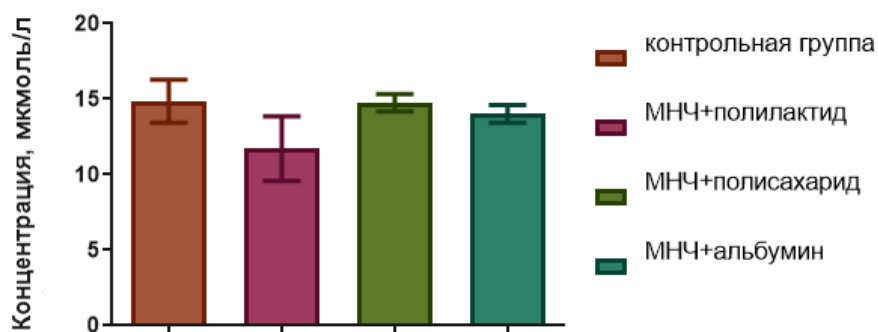
При этом в условиях введения МНЧ+полисахарид наблюдалось достоверное снижение ответа на ацетилхолин (АХ) в диапазоне концентраций 1,3-3 (мкМ),  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. С увеличением концентрации АХ до 3-10 мкМ отмечалось приближение расслабления к уровню в контрольной группе.

Таким образом, однократное внутривенное введение крысам МНЧ+полилактид и МНЧ+альбумин не вызывает изменений функциональной активности артериальных сосудов, в то время как введение МНЧ+полисахарид снижает релаксационную функцию с сохранением способности к сокращению.

В образцах плазмы крыс всех экспериментальных групп уровень NO в статистически не различался ( $p > 0,05$ ). Артериальные сосуды в образцах всех исследуемых групп имели типичное гистологическое строение (*рисунок 67 А-Г*). Гистохимическая окраска по Перлсу показала отсутствие во всех исследованных образцах соединений трехвалентного железа. В основе развития эндотелиальной дисфункции на фоне воздействия наночастиц может лежать различные механизмы, одним из которых можно рассматривать повреждающее действие активных форм кислорода (АФК) [65].

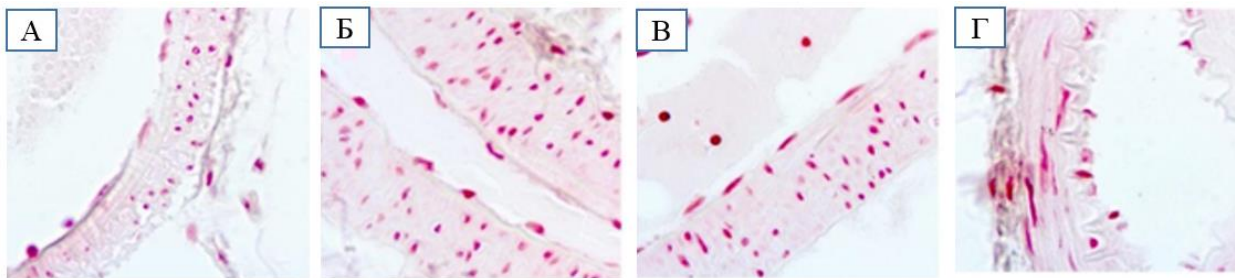
При этом АФК могут обеспечивать свое влияние как через снижение биологической активности NO за счет образования пероксинитрита, являющимся высокотоксичным соединением, способным обуславливать дополнительное повреждение, так и через окислительную модификацию компонентов клеток [305]. Показано, что МНЧ в диапазоне нецитотоксических доз способны нарушать структуру эндотелия и за счет этого обуславливать субклеточную транслокацию и ингибирование ферментов эндотелиальной NO-синтазы и снижение в конечном счете продукции NO [305]. Снижение релаксационной функции сосудов на фоне введения МНЧ+полисахарид, очевидно, не связано с доступностью NO (о чем свидетельствует неизменный (относительно контроля и других видов

наночастиц) уровень плазменного NO (рисунк 66). Предположение о возможной активной интернализации наночастиц в эндотелий как влияния на расслабляющую функцию сосудов также не нашло своего подтверждения в ходе проведенного гистологического анализа с окраской по Перлсу. Можно предполагать, что эффекты данного вида наночастиц реализуются на различных уровнях формирования рецепторного ответа на воздействие АХ.



**Рисунок 66- Плазменные уровни оксида азота в условиях однократного внутривенного введения магнитных наночастиц с различными оболочками**

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина.



**Рисунок 67 - Срезы сосудов, полученных от крыс после однократного внутривенного введения магнитных наночастиц с различными оболочками**

*Примечание:* А. Контроль; Б. Наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; В. Наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; Г. Наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. Окраска по Перлсу, ув.× 400.

Таким образом, однократное внутривенное введение крысам МНЧ+полилактид и МНЧ+альбумин не вызывает изменений функциональной активности артериальных сосудов, в то время как введение МНЧ+полисахарид приводит к снижению релаксационной способности сосудов. Все виды МНЧ не вызывают морфологических изменений артериальных сосудов.

#### **4.3 - Исследование патофизиологических эффектов модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа при их однократном внутривенном введении крысам**

Исследование патофизиологических эффектов магнитных наночастиц (МНЧ), покрытых различными оболочками, проводили на крысах, которым осуществляли однократное в один прием внутривенное введение со скоростью 1 мл/мин различных доз наночастиц: 200,0, 100,0, 50,0 и 25,0 мг/кг, объем введения при этом составлял: 10,0, 5,0, 2,5, 1,25 мл/кг. Оценивали: выживание животных, клинические признаки нарушения здоровья животных, наличие изменений гематологических показателей крови, а также морфологические изменения в органах.

Распределение погибших животных по дням представлено в таблице 33, сводные данные смертности животных приведены в таблице 34.

После введения МНЧ-полилактид в группе, получившей большую дозу (200,0 мг/кг) погибло 9 животных из 10. После однократного внутривенного введения МНЧ+полилактид в дозе 100,0 мг/кг погибло 3 крысы из пяти. Все животные погибли сразу после введения. В группах, получивших МНЧ+полилактид в дозах 50,0 и 25,0 мг/кг, гибели не наблюдалось.

После однократного внутривенного введения МНЧ+полисахарид гибель наблюдалась только в группе, получившей вещество в дозе 200,0 мг/кг: погибло 4 крысы из пяти. При этом при введении МНЧ+полисахарид в дозах

100,0, 50,0, и 25,0 мг/кг, гибели животных не наблюдалось. Все животные погибли сразу после введения.

После однократного внутривенного введения МНЧ+альбумин в дозах 200,0, 100,0, 50,0 мг/кг, гибели не наблюдалось.

После однократного внутривенного введения МНЧ+полилактид, МНЧ+полисахарид и МНЧ+альбумин самцам крыс установлена средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы LD<sub>50</sub>, равная: для МНЧ+полилактид 4,6 мл/кг, МНЧ+полисахарид 7,9 мл/кг и МНЧ+альбумин более 10 мл/кг.

У выжившего животного, получившего инъекцию МНЧ+полисахарид в дозе 200,0 мг/кг, клинических признаков нарушения здоровья не отмечено. У животных, получивших инъекцию МНЧ+полисахарид в дозах 25,0 и 50,0 мг/кг, клинические признаки нарушения здоровья отмечены только на 3-и сутки после введения: у одного самца каждой группы была ослаблена реакция на болевые раздражители.

В группе МНЧ+полисахарид 100,0 мг/кг на 3-и сутки у двух из пяти животных была повышенная реакция на тактильные раздражители, на 6-е сутки у одного животного отмечалась ослабленная реакция на болевые раздражители.

У животных, получивших инъекцию МНЧ-полилактид в дозе 100,0 мг/кг, клинических признаков нарушения здоровья не отмечено. У животных, получивших инъекцию МНЧ+полилактид в дозах 25,0 и 50,0 мг/кг, клинические признаки нарушения здоровья отмечены только на 3-и сутки после введения, по одному животному показали повышение или снижение реакции на раздражители, взъерошенность шерстного покрова.

У животных, получивших инъекцию МНЧ+альбумин в дозе 25,0 мг/кг, клинических признаков нарушения здоровья не выявлено. В группе МНЧ+альбумин 50,0 мг/кг на 3-и сутки у одного животного почернел кончик хвоста, на 6-е сутки у него же состояние хвоста не изменилось, а также проявлялась ослабленная реакция на болевые раздражители. В группе

МНЧ+альбумин 100,0 мг/кг на 3-и сутки по одному животному показали ослабленную реакцию на болевые раздражители, повышенную реакцию на тактильные раздражители, возбужденное поведение, у одного самца почернел кончик хвоста (на 6-е сутки состояние хвоста не изменилось). На 6-е сутки у двух самцов реакцию на болевые раздражители была ослабленной, у одного наблюдалась повышенная реакция на тактильные раздражители. В группе МНЧ+альбумин 200,0 мг/кг на 3-и сутки у одного животного отмечалась повышенная реакция на тактильные раздражители, она сохранялась у него и на 6-е сутки. У трех животных на 6-е сутки наблюдалось ослабление реакции на болевые раздражители.

**Таблица 33 - Количество погибших самцов крыс в разные дни после однократного внутривенного введения магнитных наночастиц с различными оболочками в различных дозах**

Группы животных	Количество животных в группе до введения	Дни после введения*										Количество животных в группе через 9 дней после введения	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
МНЧ+полилактид 200,0 мг/кг	10	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
МНЧ+полилактид 100,0 мг/кг	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
МНЧ+полилактид 50,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+полилактид 25,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+полисахарид 200,0 мг/кг	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
МНЧ+полисахарид 100,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+полисахарид 50,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+полисахарид 25,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+альбумин 200,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+альбумин 100,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+альбумин 50,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
МНЧ+альбумин 25,0 мг/кг	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. \*В случае, когда животное погибло в промежуток между концом одного рабочего дня и началом следующего, за день гибели принимался день обнаружения трупа. Животные групп МНЧ+полилактид в дозе 200,0 мг/кг и МНЧ+полисахарид в дозе 200,0 мг/кг были исключены из дальнейшего анализа.



Индивидуальные данные клинического осмотра крыс всех экспериментальных групп отражены в таблице 32.

**Таблица 32 - Индивидуальные данные обнаруженных клинических нарушений у крыс на фоне введения различных доз модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц**

<b>Вводимый вид МНЧ</b>		
<b>МНЧ+полисахарид в дозе 25,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Ослабленная реакция на болевые раздражители	1	0
<b>МНЧ+полисахарид в дозе 50,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Ослабленная реакция на болевые раздражители	1	0
<b>МНЧ+полисахарид в дозе 100,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Ослабленная реакция на болевые раздражители	0	1
Повышенная реакция на тактильные раздражители	2	0
<b>МНЧ+полилактид в дозе 25,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Повышенная реакция на тактильные раздражители	1	0

<b>МНЧ+полилактид в дозе 50,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Взъерошенная шерсть	1	0
Ослабленная реакция на тактильные раздражители	1	0
<b>МНЧ+альбумин дозе 50,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Ослабленная реакция на болевые раздражители	0	1
Почернел кончик хвоста	1	1
<b>МНЧ+альбумин в дозе 100,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Ослабленная реакция на болевые раздражители	1	2
Возбужденное поведение	1	0
Повышенная реакция на тактильные раздражители	0	1
Почернел кончик хвоста	1	1
<b>МНЧ+альбумин в дозе 200,0 мг/кг</b>		
Клинические признаки нарушения здоровья	Количество животных с указанным признаком в разное время после введения:	
	Время от начала введения	
	Дни наблюдения	
	3 сут	6 сут
Повышенная реакция на тактильные раздражители	1	1
Ослабленная реакция на болевые раздражители	0	3

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина.

Результаты гематологического анализа самцов крыс через 9 дней после однократного внутривенного введения магнитных наночастиц с различными оболочками (МНЧ+полилактид, МНЧ+полисахарид и МНЧ+альбумин) в дозах 200,0, 100,0, 50,0 и 25,0 мг/кг отражены в таблице 33. Гематологические показатели сравнивали между контрольной и опытными группами, а также между соответствующими опытными группами (группами идентичного объема введения). По окончании наблюдения на 9-й день гематологические показатели опытных и контрольных групп не различались между собой. Не обнаружено также различий между опытными группами.

Обнаруженные патологические изменения при проведении плановой некропсии самцов крыс через 9 дней после однократного внутривенного введения магнитных наночастиц (МНЧ+полилактид, МНЧ+полисахарид и МНЧ+альбумин) в дозах 200,0, 100,0, 50,0 и 25,0 мг/кг отражены в таблице 34.

Основные изменения касались следующих органов: печени, легких. В группе МНЧ+полилактид 100,0 мг/кг отмечено венозное полнокровие печени у одного животного из двух, у двух животных – патологические изменения в легких, кровоизлияния. В группе МНЧ+полисахарид 50,0 мг/кг у двух животных из пяти, в группе МНЧ+полилактид 100,0 мг/кг у всех (двух) и МНЧ+полилактид 25,0 мг/кг у трех (из пяти), а также в группе МНЧ+альбумин 1,25 мг/кг у одного (из пяти) обнаружен темный цвет тимуса. Кровоизлияния в тимус выявлены у двух (из двух) животных группы МНЧ+полилактид 100,0 мг/кг и у одного из пяти в группе МНЧ+полилактид 25,0 мг/кг. В других органах значимых изменений макроскопически не обнаружено.

**Таблица 33 - Результаты гематологического анализа самцов крыс через 9 дней после однократного внутривенного введения различных доз магнитных наночастиц с различными оболочками\***

Показатель	Вводимое вещество, доза										
	ФР (контроль)	МНЧ+полисахарид			МНЧ+полилактид			МНЧ+альбумин			
		25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг	25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг	25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг	200 мг/кг
Число лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	6,97 $\pm$ 2,02	10,70 $\pm$ 2,33	9,10 $\pm$ 1,49	8,26 $\pm$ 1,11	10,28 $\pm$ 0,93	9,73 $\pm$ 1,26	9,40 $\pm$ 1,10	9,23 $\pm$ 1,84	9,95 $\pm$ 1,66	9,50 $\pm$ 0,26	7,95 $\pm$ 1,67
Доля лимфоцитов, %	11,33 $\pm$ 2,51	17,20 $\pm$ 2,62	12,06 $\pm$ 0,96	14,02 $\pm$ 1,59	12,20 $\pm$ 1,06	16,60 $\pm$ 1,26	19,35 $\pm$ 0,15	14,78 $\pm$ 1,90	14,83 $\pm$ 2,35	14,13 $\pm$ 1,1	15,10 $\pm$ 1,42
Доля моноцитов, %	35,57 $\pm$ 3,66	34,80 $\pm$ 0,96	36,80 $\pm$ 2,11	41,20 $\pm$ 1,66	35,85 $\pm$ 1,96	36,90 $\pm$ 0,89	36,50 $\pm$ 1,50	41,05 $\pm$ 3,96	35,85 $\pm$ 3,14	36,93 $\pm$ 1,7	37,83 $\pm$ 1,27
Доля гранулоцитов, %	53,10 $\pm$ 6,16	48,00 $\pm$ 1,70	51,14 $\pm$ 2,40	44,78 $\pm$ 0,80	51,95 $\pm$ 2,88	46,50 $\pm$ 0,94	44,15 $\pm$ 1,35	44,18 $\pm$ 2,19	49,33 $\pm$ 3,32	48,93 $\pm$ 0,5	47,08 $\pm$ 0,37
Число лимфоцитов $\times 10^9/\text{л}$	0,83 $\pm$ 0,38	1,68 $\pm$ 0,34	1,04 $\pm$ 0,19	1,10 $\pm$ 0,17	1,20 $\pm$ 0,11	1,63 $\pm$ 0,32	1,75 $\pm$ 0,25	1,40 $\pm$ 0,36	1,43 $\pm$ 0,29	1,27 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,39
Число моноцитов, $\times 10^9/\text{л}$	2,57 $\pm$ 0,91	3,73 $\pm$ 0,85	3,22 $\pm$ 0,46	3,38 $\pm$ 0,53	3,63 $\pm$ 0,40	3,55 $\pm$ 0,44	3,35 $\pm$ 0,25	3,53 $\pm$ 0,51	3,40 $\pm$ 0,29	3,47 $\pm$ 0,09	2,90 $\pm$ 0,54
Число гранулоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	3,57 $\pm$ 0,74	5,30 $\pm$ 1,18	4,84 $\pm$ 0,94	3,78 $\pm$ 0,50	5,45 $\pm$ 0,60	4,55 $\pm$ 0,50	4,30 $\pm$ 0,60	4,30 $\pm$ 0,98	5,13 $\pm$ 1,18	4,77 $\pm$ 0,19	3,85 $\pm$ 0,76
Число эритроцитов $\times 10^{12}/\text{л}$	6,24 $\pm$ 0,91	6,97 $\pm$ 0,27	7,00 $\pm$ 0,21	6,98 $\pm$ 0,22	6,75 $\pm$ 0,09	7,31 $\pm$ 0,14	6,82 $\pm$ 0,08	6,99 $\pm$ 0,32	7,10 $\pm$ 0,27	7,06 $\pm$ 0,11	6,91 $\pm$ 0,20
Концентрация гемоглобина, г/л	142,00 $\pm$ 23,7	168,7 $\pm$ 56,52	167,00 $\pm$ 3,18	163,80 $\pm$ 3,40	162,25 $\pm$ 4,82	165,75 $\pm$ 4,3	165,50 $\pm$ 1,50	163,75 $\pm$ 5,04	164,75 $\pm$ 6,66	163,67 $\pm$ 3	155,00 $\pm$ 6,1
Гематокрит, %	24,23 $\pm$ 3,99	27,78 $\pm$ 0,93	27,36 $\pm$ 0,88	27,94 $\pm$ 0,98	26,90 $\pm$ 0,35	28,50 $\pm$ 1,13	26,25 $\pm$ 0,25	27,13 $\pm$ 0,88	27,78 $\pm$ 0,93	27,93 $\pm$ 0,3	26,38 $\pm$ 0,86
Средний объем эритроцитов, $\text{мм}^3$	38,63 $\pm$ 0,92	40,03 $\pm$ 1,30	39,12 $\pm$ 0,26	40,14 $\pm$ 0,84	39,95 $\pm$ 0,58	39,00 $\pm$ 1,02	38,55 $\pm$ 0,05	38,98 $\pm$ 0,58	39,23 $\pm$ 0,18	39,60 $\pm$ 1,0	38,23 $\pm$ 0,23

Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	22,57±0,56	24,20±0,72	23,86±0,44	23,48±0,45	24,00±0,91	22,63±0,36	24,25±0,05	23,43±0,47	23,15±0,06	23,13±0,4	22,35±0,28
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	585,33±4,33	607,00±6,79	611,20±12,88	587,20±10,11	602,50±16,74	581,75±8,1	630,00±0,00	603,50±6,81	592,25±3,79	585,33±18	586,75±8,6
Ширина распределения эритроцитов по объему, %	11,50±0,25	10,90±0,14	11,18±0,20	10,90±0,16	11,18±0,14	11,18±0,11	11,50±0,00	11,15±0,23	11,35±0,05	10,93±0,1	10,88±0,21
Стандартное отклонение от среднего значения объема тромбоцитов, мм <sup>3</sup>	20,80±0,75	21,78±0,62	21,84±0,26	21,06±0,64	21,13±0,33	21,13±0,62	22,10±0,00	21,45±0,38	21,13±0,33	21,67±0,4	21,13±0,33
Число тромбоцитов, x10 <sup>9</sup> /л	474,00±122	589,50±68,76	588,00±36,02	539,40±45,77	553,50±33,35	590,25±54,5	517,00±1,00	474,75±73,45	617,25±20,1	594,67±36	569,50±31,5
Средний объем тромбоцита, мм <sup>3</sup>	7,37±0,22	7,35±0,24	7,02±0,14	7,10±0,16	7,30±0,04	7,40±0,22	7,00±0,00	7,45±0,10	7,30±0,12	7,27±0,18	7,08±0,17
Ширина распределения тромбоцитов по объему, мм <sup>3</sup>	12,07±0,27	12,78±0,45	12,06±0,34	12,50±0,54	12,18±0,26	12,83±0,46	11,85±0,35	12,83±0,57	12,93±0,32	12,10±0,3	11,83±0,39

Продолжение таблицы 33

Тромбокрит, %	0,27±0,08	0,43±0,04	0,41±0,03	0,38±0,03	0,40±0,03	0,44±0,05	0,36±0,00	0,35±0,05	0,45±0,02	0,43±0,02	0,40±0,02
Доля крупных тромбоцитов, %	13,00±1,01	13,38±1,57	11,32±0,74	11,20±0,87	13,05±0,33	14,15±1,68	11,95±0,65	13,58±0,74	13,03±0,68	12,90±0,7	12,30±0,87
Число крупных тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	45,67±12,72	76,25±6,52	66,60±6,98	58,60±3,98	72,00±5,61	84,00±14,0	61,50±3,50	64,00±10,08	80,00±4,80	75,67±2,0	69,75±7,12

*Примечания:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. В таблице представлены данные при  $n$  больше 1; \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $P < 0,05$  между соответствующими показателями опытных групп.

**Таблица 34 - Выявленные при плановой некропии патологические изменения у самцов крыс через 9 дней после однократного внутривенного введения различных доз магнитных наночастиц с различными оболочками**

Выявленное изменение	Количество животных с изменением									
	Вводимое вещество, доза, мг/кг									
	МНЧ+полисахарид			МНЧ+полилактид			МНЧ+альбумин			
	100 n=5	50 n=5	25 n=5	100 n=2	50 n=5	25 n=5	200 n=5	100 n=5	50 n=5	25 n=5
Венозное полнокровие печени	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Патологические изменения в легких	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Кровоизлияния в легкие	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Темный цвет тимуса	0	2	0	2	0	3	0	0	0	1
Кровоизлияния в тимусе	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0

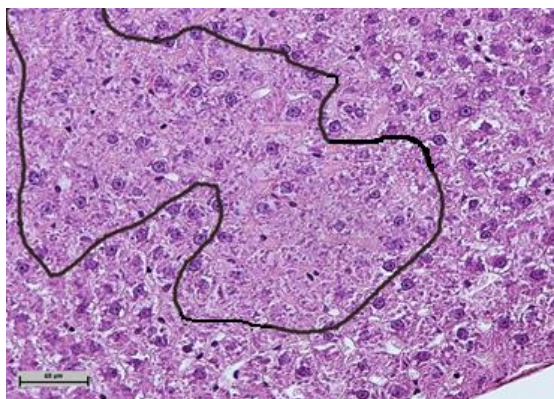
*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина.

На основании выявленных при макроскопическом исследовании изменений было принято решение о проведении гистологического анализа печени и легких.

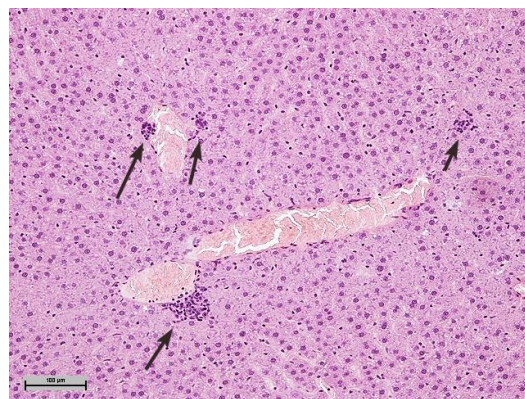
Для гистологического анализа были взяты препараты ткани печени и легких самцов крыс после однократного внутривенного введения магнитных наночастиц с различными оболочками (МНЧ+полилактид, МНЧ+полисахарид и МНЧ+альбумин) в дозе 100,0 мг/кг. Данные группы были выбраны на основании того, что животные этих групп дожили до некропии в количестве, достаточном для сравнения вызванных каждым из видов магнитных наночастиц патоморфологических изменений, получив при этом максимальную дозу тестируемых веществ.

В представленных гистологических препаратах ткани печени животных с введением МНЧ+полисахарид наблюдалась мозаичная картина неспецифических реактивных изменений негнойного подострого характера от дистрофических изменений до асептического некроза (рисунк 68). В отдельных случаях наблюдались следующие изменения: грубые нарушения балочного строения печеночной дольки: отсутствовала линейность, наблюдался выраженный отек гепатоцитов, появление двуядерных клеток; пространство синусоидов резко сужено за счет набухших гепатоцитов; в синусоидах отмечалось отчетливое повышение клеток Купфера (пролиферация пула); диффузно чаще в периваскулярных участках в зоне центральных вен располагались единичные очаги круглоклеточной инфильтрации с поврежденными эпителиальными клетками; очаги по возрасту соответствовали молодым; отмечались участки асептических некрозов, чаще встречающиеся в субкапсулярных зонах.

А.



Б.



**Рисунок 68 - Ткань печени крыс после однократного внутривенного введения наночастиц магнетита с оболочкой из полисахарида**

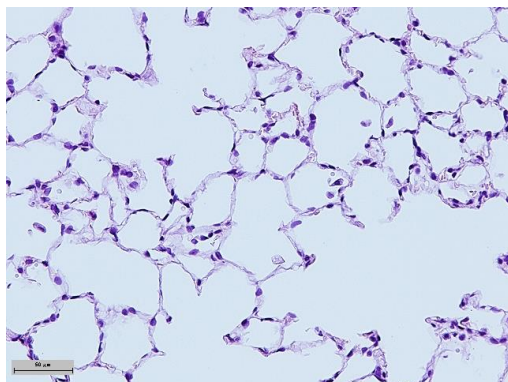
*Примечание:* А. Асептический некроз гепатоцитов в субкапсулярной зоне. Б. Свежие очаги круглоклеточной инфильтрации в периваскулярной области. Стрелками обозначены круглоклеточные инфильтраты. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. × 200.



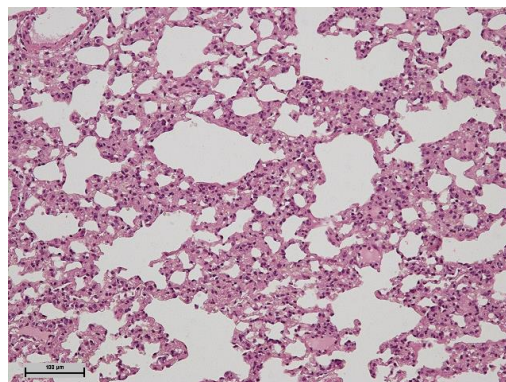
Признаков апоптоза гепатоцитов, присутствия клеток, депонирующих железо-содержащие гранулы (гемосидерофаго-подобных клеток) не наблюдалось. В зависимости от биологического объекта полнокровие сосудов было представлено в разной степени – от минимальной до выраженной.

Введение МНЧ+полисахарид не приводило к видимым изменениям ткани респираторного отдела легкого (*рисунок 69*). Толщина альвеолярных перегородок была сохранена, макрофагальная инфильтрация отсутствовала. Гранулемообразования не наблюдалось. Отмечалось умеренное полнокровие сосудов. Со стороны висцеральной плевры не наблюдалось утолщений, инфильтрации.

А.



Б.

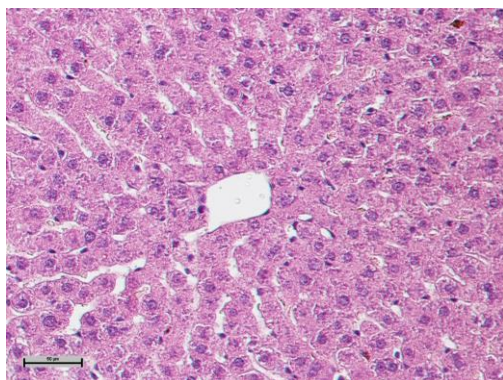


**Рисунок 69 - Ткань легкого крыс после однократного внутривенного введения наночастиц магнетита с оболочкой из полисахарида**

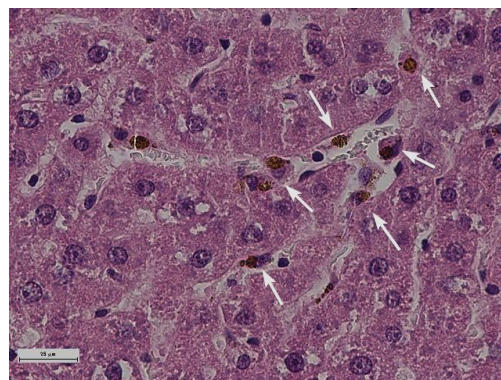
*Примечание:* А. Участок неизменной легочной ткани; Б. Изменения респираторного отдела (альвеолярных стенок) за счет отека, пролиферации эпителиальных и круглоклеточных элементов. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 200$ .

На гистологических препаратах ткани печени животных, получавших МНЧ+полилактид, отмечались неспецифические реактивные изменения, негнойного подострого характера без признаков некроза (*рисунок 70*). Наблюдалось нарушение балочного строения печеночной дольки умеренной степени: частично нарушенная линейность, дистрофические изменения гепатоцитов, гиперхромия, зернистость цитоплазмы гепатоцитов, пространство синусоидов было несколько сужено.

А.



Б.

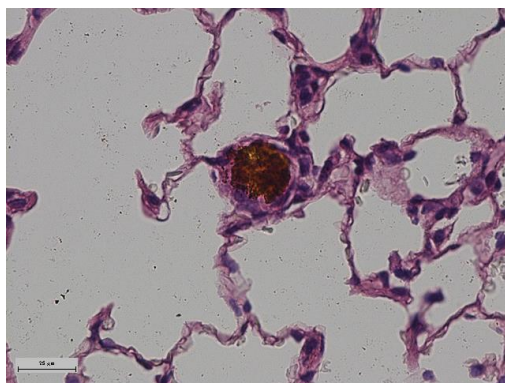


**Рисунок 70 - Ткань печени крыс после однократного внутривенного введения наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида**  
*Примечание:* А. Реактивные изменения: гиперхромия ядер, зернистость цитоплазмы гепатоцитов. Б. Очаговые круглоклеточные инфильтраты с включением гемосидерофагоподобных клеток. Обозначены клетки с железосодержащими включениями. Стрелками обозначены круглоклеточные инфильтраты. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 200$ .

Визуально отмечалось повышение численности клеток Купфера (пролиферация пула) в синусоидах. В синусоидах наблюдалось значительное количество крупных клеток с включением гранул коричневого цвета, сходными с гемосидерином (специфической окраски на гемосидерин не проводили), местами располагающихся по 2-3 клетки. Наблюдались единичные очаги круглоклеточной инфильтрации (по типу молодых гранулем), чаще расположенных в периваскулярных зонах. В ряде инфильтратов встречались макрофагальные клетки, содержащие коричневые

гранулярные включения в цитоплазме. Признаков асептического некроза ткани, апоптоза гепатоцитов, наличия сидерофагов не наблюдалось. Сосуды характеризовались неравномерным полнокровием разной степени - от минимальной до выраженной.

Введение суспензии МНЧ+полилактид не вызывало и грубых изменений респираторного отдела легкого (*рисунок 71*). Толщина альвеолярных перегородок была сохранена. Наблюдалась умеренная степень реакции альвеолярных и/или интерстициальных макрофагов, фиксирующих гранулы коричневого цвета (по типу гемосидерофагов). Единичные, диффузно располагающиеся истинные макрофагальные гранулемы в интерстиции респираторных участков паренхимы. Отмечалось умеренное полнокровие сосудов. Со стороны висцеральной плевры не наблюдалось утолщений, инфильтрации.



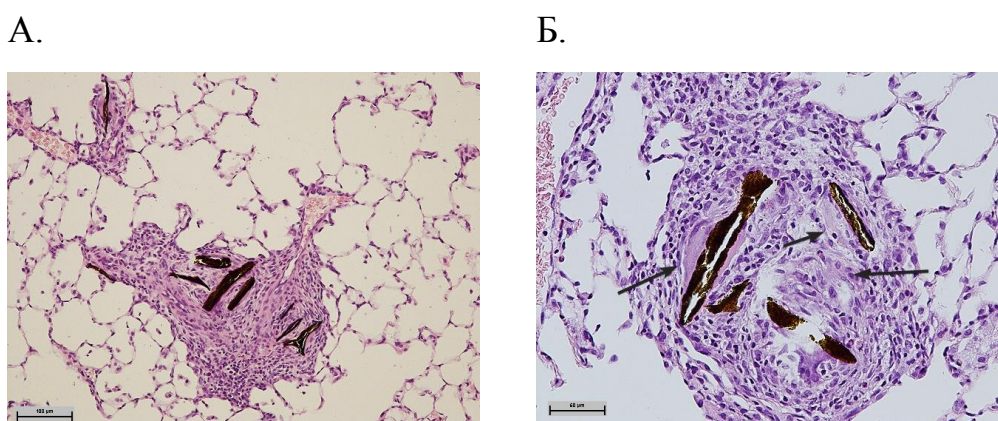
**Рисунок 71 - Ткань респираторного отдела легкого, полученного от животного с однократным внутривенным введением наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида**

*Примечание:* Наблюдаются недифференцированные макрофаги, содержащие мелкие гранулы коричневого цвета (по типу гемосидерофагов). Окраска гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 200$ .

В ткани печени животных, получавших МНЧ+альбумин грубых изменений не наблюдалось. Балочное строение было сохранено, наблюдался умеренный отек гепатоцитов, гиперхромия цитоплазмы, синусоиды прослеживались с разным просветом. Отмечалось венозное полнокровие в

сосудах бассейна печеночной вены (междольковые вены). Признаков асептического некроза, апоптоза гепатоцитов, присутствия гемосидерофагоподобных клеток не наблюдалось. Очаги клеточных инфильтратов отсутствовали.

Введение МНЧ+альбумин приводило к инфильтративной реакции в ткани легкого (рисунок 72). В интерстиции часто встречались различных размеров истинные гранулемы инородных тел, местами сливающиеся друг с другом, представленные макрофагальными элементами: клетки, фиксирующие коричневые, железо-содержащие гранулы (по типу гемосидерофагов), а также молодые клетки Пирогова-Ланганса. Гранулемные инфильтраты формировались вокруг просветов сосудов, эмболизированных коричневым (железо-содержащим) преципитатом. Наблюдалось выраженное венозное полнокровие сосудов.



**Рисунок 72 - Ткань легкого крыс после однократного внутривенного введения наночастиц магнетита с оболочкой из альбумина**

*Примечание:* А. Истинные гранулемы вокруг участков эмболизированных сосудов; Б. Стрелкой отмечены гигантские клетки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 200$ .

В группах с введением наночастиц с оболочкой из альбумина гибели животных не наблюдалось, поэтому затруднительно сравнивать все три вещества по срокам гибели. Для всех изученных магнитных наночастиц

(МНЧ+полилактид, МНЧ+полисахарид и МНЧ+альбумин) не было отмечено зависимости между количеством животных с клиническими признаками нарушения здоровья и введенной дозой. Основным признаком было изменение реакции на внешние раздражители. В группе с введением крысам наночастиц с оболочкой из альбумина у одного животного отмечался некроз кончика хвоста, возникший, вероятно, из-за тромбоза сосудов в результате инъекции. Таким образом, по клиническим признакам нарушения здоровья группы не различались. Выжившие животные достаточно быстро восстанавливались после введения, о чем свидетельствует и стабильная масса их тела в период наблюдения. Гематологические показатели через 9 дней после однократного внутривенного введения во всех группах не отличались от контроля. Оснований для проведения биохимического и коагулометрического исследования не выявлено, все значимые изменения происходили в короткие сроки после введения, поэтому данные виды исследований не проводились.

При плановой некропии животных основные патоморфологические изменения выявлены в печени, легких и тимусе. У части животных отмечено венозное полнокровие печени и патологические изменения в легких, у большего числа животных, получавших разные магнитные наночастицы, обнаружены изменения цвета тимуса и кровоизлияния в ткань тимуса. Изменения в тимусе отмечены у животных, получавших все три вида магнитных наночастиц, при этом между количеством животных с изменениями и введенным объемом зависимости нет. Эти изменения скорее являются следствием стресс-реакции на экспериментальные воздействия, чем действием вводимого вещества. Такая стресс-реакция вероятна из-за иммобилизации животных при введении. Большой интерес вызывают изменения в печени и легких. На основании этого было принято решение о проведении гистологического изучения печени и легких, для чего были взяты препараты ткани печени и легких самцов крыс после однократного внутривенного введения магнитных наночастиц с разным покрытием (МНЧ+полилактид, МНЧ+полисахарид и МНЧ+альбумин) в дозе 100,0 мг/кг.

Для детализации патоморфологических нарушений в этих органах было предпринято их гистологическое исследование, которое выявило признаки гепато- и пульмонотоксичности. По степени гепатотоксичности (выраженности реактивных изменений в печени), изучаемые магнитные наночастицы можно расположить следующим образом: МНЧ+полисахарид > МНЧ+полилактид >> МНЧ+альбумин. По степени пульмотоксичности (выраженности гранулемообразования) изучаемые образцы магнитных наночастиц можно представить следующим образом: МНЧ+альбумин >> МНЧ+полилактид > МНЧ+полисахарид. При этом модифицированные оболочками МНЧ, характеризующиеся наиболее выраженной гепатотоксичностью (МНЧ+полисахарид), оказывают наименьшее повреждающее действие на ткани легкого. Также МНЧ, обладающие наибольшим влиянием на легочную ткань, вызывают наименьшие реактивные изменения в печени.

Предположительно, выявленные различия в выраженности оказываемых эффектов наночастиц в отношении печени и легких обусловлены характеристиками качественного состава оболочек, которые могут определять преимущественный характер органного биораспределения. Так, покрытие МНЧ оболочкой из альбумина могло способствовать максимальной тропности МНЧ+альбумин к паренхиме легкого, как органа, капиллярное русло которого первым контактировало с внутривенно вводимой суспензией. При этом накопление данного вида МНЧ в капиллярной системе легкого могло снизить доступность наночастиц для органов большого круга кровообращения. Модификация поверхности наночастиц оболочкой из полисахарида способствовало относительно свободному прохождению МНЧ+полисахарид через капиллярное русло легких и их равномерное распределение в органах большого круга кровообращения. В данном случае неспецифические реактивные изменения в ткани печени могут отражать локальное накопление МНЧ+полисахарид в печени, как в органе выделительной системы.

Таким образом, внутривенное введение МНЧ+альбумин во всех используемых дозах характеризуется отсутствием гибели животных, тогда как внутривенное введение высоких доз (200,0 мг/кг) МНЧ+полилактид и МНЧ+полисахарид вызывает их гибель. Все виды покрытых оболочками МНЧ характеризуются гепато- и пульмонотоксичностью, при этом выраженность повреждающих эффектов наночастиц на данные органы зависит от качественного состава их оболочки.

На основании суммирования полученных данных о токсичности наночастиц и их влияния на релаксационную способность сосудов можно сделать вывод о наибольшей биосовместимости наночастиц с оболочками из полилактида и альбумина.

#### **4.4 - Влияние модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц оксида железа на генерацию активных форм кислорода при инкубации с кровью человека**

Общепризнанным механизмом токсичности наночастиц является интенсификация процессов свободно-радикального окисления [125, 206]. Качественный состав оболочки является одним из ключевых факторов, определяющим биологические эффекты наночастиц и их токсикологический профиль [159, 205, 346]. В ряде работ показана дозозависимая токсичность наночастиц на основе оксида железа, опосредованная избыточной генерацией АФК [138, 235, 277]. Покрытие наночастиц различными оболочками широко используется для повышения биосовместимости наночастиц, в том числе за счет обеспечения снижения их реакционной способности [3, 307].

Таким образом отдельным этапом работы явилось сравнительное исследование дозозависимого влияния магнитных наночастиц с различными оболочками на генерацию активных форм кислорода (АФК) при их инкубации с цельной кровью человека.

Эксперименты проводили на образцах гепаринизированной крови человека, к которым в соотношении 1:1 добавляли суспензию МНЧ+полилактид или МНЧ+альбумин или МНЧ+полисахарид в концентрациях 0,2, 1,0 и 2,0 мг/мл. Оценку генерации АФК осуществляли методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) через 3 часа инкубации наночастиц с кровью.

Исходные интегральные значения интенсивности спонтанной ХЛ во всех исследуемых группах были близки по значению ( $p > 0,05$ ) (таблица 35).

**Таблица 35 - Интегральные значения интенсивности спонтанной хемилюминесценции (S, о.е.) цельной крови в условиях воздействия модифицированных различными оболочками магнитных наночастиц через 3 часа инкубации с цельной кровью**

Вид МНЧ	Концентрация МНЧ, мг/мл	Время инкубации, мин
		180
Контроль	-	12,7±3,3
МНЧ+полилактид	0,2	4,2±0,5#
МНЧ+альбумин		61,9±9,1#/&
МНЧ+полисахарид		136,5±56,7*/&
МНЧ+полилактид	1,0	8,5±4,5 #/&
МНЧ+альбумин		12,13±0,5#
МНЧ+полисахарид		94,8±5,1*/x/&
МНЧ+полилактид	2,0	3,8±0,4#
МНЧ+альбумин		9,6±1,9#
МНЧ+полисахарид		52,3±10,0 о/х

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. \*P < 0,05 по сравнению с контролем; °P < 0,05 по сравнению с наименьшей концентрацией данного вида МНЧ; xP < 0,05 по сравнению с меньшей концентрацией данного вида МНЧ; #P < 0,05 по сравнению с соответствующим значением в группе МНЧ+полисахарид; &P < 0,05 по сравнению с соответствующим значением через 60 мин инкубации.



Через 3 часа инкубации с МНЧ+полисахарид в дозах 0,2, 1,0 и 2,0 мг/мл наблюдалось увеличение параметров ХЛ (*таблица 35*), при этом на фоне воздействия МНЧ+альбумин в дозах 1,0 и 2,0 мг/мл изменения параметров ХЛ не наблюдалось. МНЧ+полилактид во всех используемых дозах снижали спонтанную ХЛ.

Таким образом, выявленное нами резкое увеличение спонтанной ХЛ крови под воздействием МНЧ+полисахарид позволяет предполагать вклад активации свободнорадикального механизма в реализацию оказываемых данным видом наночастиц вышеописанных повреждающих эффектов. Повреждающие эффекты МНЧ+альбумин и МНЧ+полилактид, вероятно, реализуются за счет иных механизмов, не связанных с избыточной генерацией АФК.

Различные клинические ситуации могут сопровождаться изменением уровня АФК. Так, несмотря на то, что на сегодняшний день обсуждаются причинно-следственные связи между высокими уровнями АФК и опухолевым процессом, очевидно, что для опухолевых клеток характерен повышенный уровень АФК, который может быть связан с увеличением метаболической активности клеток, дисфункцией митохондрий, повышенной активностью пероксисом, активацией воспалительных и вовлечением иммунных клеток и т.д. [189, 216]. Также показано, что изменение окислительно-восстановительного баланса в миокарде коррелирует со степенью его некроза после инфаркта, а также с выраженностью реперфузионного повреждения [329]. С учетом выявленного эффекта МНЧ+полилактид в виде снижения спонтанной ХЛ, можно предполагать способность данного вида наночастиц к снижению уровня АФК в условиях их избыточной генерации. В связи с этим, для данного вида МНЧ было проведено исследование, посвященное изучению их влияния на уровень АФК, вырабатываемых клетками, находящимися в условиях окислительного стресса

#### **4.5 - Влияние магнитных наночастиц оксида железа, покрытых оболочкой из полилактида, на генерацию активных форм кислорода в условиях индуцированного окислительного стресса**

Эксперимент проводили на образцах гепаринизированной крови человека, к 100 мкл которых добавляли эквивалентный объем МНЧ+полилактид и инкубировали в течение 3 часов. Для измерения ХЛ добавляли опсонизированный зимозан, являющийся индуктором генерации клетками АФК, с дальнейшей регистрацией показателей индуцированной ХЛ в течение 30 мин.

Добавление зимозана резко усиливало генерацию АФК, оцениваемую по уровню ХЛ (*таблица 36*). В присутствии МНЧ+полилактид наблюдалось значительное снижение ХЛ, при этом с увеличением дозы МНЧ от 0,2 до 2 мг/мл отмечалось усиление эффекта (*таблица 36*).

Для подтверждения полученных данных был проведен эксперимент на модели индуцированного окислительного гемолиза эритроцитов (КГ). При воздействии гипохлорита натрия (ГХН) в ходе эксперимента отмечалось увеличение (*рисунок 73*) КГ (22% - через 1 час после добавления ГХН; 38% - на момент окончания эксперимента). МНЧ+полилактид в концентрации 0,2 мг/мл снижали ГК относительно контроля (на 29,2% - через 1 час и на 36% - через 3 часа инкубации). При увеличении дозы МНЧ+полилактид до 0,1 и 2,0 мг/мл не наблюдалось усиления описанного эффекта.

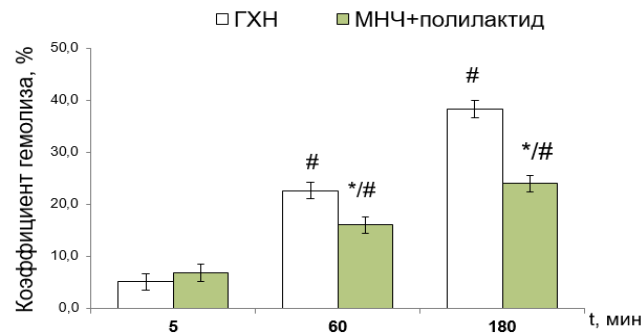
В основе снижения индуцированной ХЛ в условиях воздействия МНЧ+полилактид могут лежать различные механизмы. Можно предполагать способность данного вида наночастиц связывать свободные радикалы, стимулирование наночастицами антиоксидантных систем, а также сочетание данных механизмов.

**Таблица 36 - Время достижения максимальной интенсивности свечения индуцированной хемилюминесценции ( $X_{\max}$ ), максимальная интенсивность свечения ( $I_{\max}$ ) и интегральное значение интенсивности индуцированной хемилюминесценции (S) цельной крови через 3 часа инкубации с наночастицами с оболочкой из полилактида**

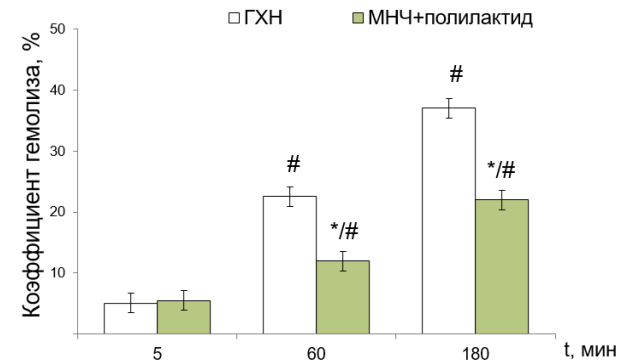
Вид МНЧ	Концентрация МНЧ, мг/мл	Время инкубации, мин
		180
$X_{\max}$ , с		
Контроль	-	13±5
МНЧ+полилактид	0,2	2,7±0,6 <sup>*/#</sup>
МНЧ+полилактид	1	1,8±0,5 <sup>*/#</sup>
МНЧ+полилактид	2	1,4±0,2 <sup>*/#/@</sup>
$I_{\max}$ , имп/с		
Контроль	-	13±5
МНЧ+полилактид	0,2	2,7±0,6 <sup>*/#</sup>
МНЧ+полилактид	1	1,8±0,5 <sup>*/#</sup>
МНЧ+полилактид	2	1,4±0,2 <sup>*/#/@</sup>
S, о.е.		
Контроль	-	16096±6165
МНЧ+полилактид	0,2	3364±766 <sup>*</sup>
МНЧ+полилактид	1	2258±602 <sup>*</sup>
МНЧ+полилактид	2	1695±305 <sup>*</sup>

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина. \*P < 0,05 по сравнению с контролем; # P < 0,05 по сравнению с исходными значениями в данной группе; @ P < 0,05 по сравнению с данным видом МНЧ в минимальной концентрации на аналогичной точке.

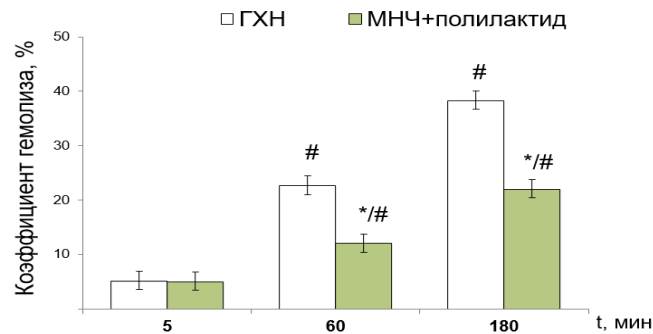
А.



Б.



В.



**Рисунок 73 - Коэффициент гемолиза эритроцитов в условиях воздействия наночастиц с оболочкой из полилактида в концентрациях**

*Примечание:* ГХН – гипохлорит натрия; MNЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида. А. Использование дозы наночастиц 0,2 мг/мл; Б. Использование дозы наночастиц 1,0 мг/мл; В. Использование дозы наночастиц 2 мг/мл. \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем; # $P < 0,05$  по сравнению с исходными значениями в данной группе.

Таким образом, наличие на поверхности наночастиц магнетита оболочки из полилактида обуславливает способность данного вида наночастиц к снижению генерации АФК как в физиологических условиях, так и в условиях окислительного стресса.

В целом, модификация поверхности наночастиц магнетита различными оболочками обуславливает различия в их физико-химических характеристиках. Так, наночастицы с оболочкой из альбумина обладают нейтральным электрокинетическим потенциалом и имеют максимальный по сравнению с другими видами МНЧ гидродинамический размер. В то же время наночастицы с оболочками из поликонденсированной глюкозы и полиэфира молочной кислоты характеризуются отрицательным дзета-потенциалом, при этом гидродинамический радиус образцов наночастиц с оболочкой из поликонденсированной глюкозы значительно меньше по сравнению с таковым в образцах МНЧ+полилактид. При этом все виды используемых наночастиц сферической формы.

Показано, что однократное внутривенное введение крысам МНЧ+альбумин и МНЧ+полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ+полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению.

Магнитные наночастицы с оболочкой из полисахарида и полилактида обладают слабой гепатотоксичностью, тогда как наночастицы с оболочкой из альбумина – пульмонотоксичностью. По степени гепатотоксичности (выраженности реактивных изменений в печени) они располагаются следующим образом: МНЧ+полисахарид > МНЧ+полилактид >> МНЧ+альбумин. По степени пульмотоксичности (выраженности гранулемообразования) изучаемые образцы магнитных наночастиц можно представить следующим образом: МНЧ+альбумин >> МНЧ+полилактид > МНЧ+полисахарид.

Также наночастицы с оболочкой из полилактида способны снижать уровень активных форм кислорода (АФК) как в интактных условиях, так и в условиях индуцированного окислительного стресса.

Таким образом, различия в качественном составе оболочек наночастиц магнетита обуславливают их различные биологические и токсикологические эффекты (*таблица 37*).

**Таблица 37 - Схематичное представление оказываемых модифицированными различными оболочками наночастицами биологических эффектов**

	МНЧ+полилактид	МНЧ+полисахарид	МНЧ+альбумин
Влияние на уровень АФК	Снижает	Повышает	Не влияет
Влияние на функциональную активность сосудов	Не влияет	Снижает сократительную активность	Не влияет
Пульмонотоксичность	++	+	+++
Гепатотоксичность	++	+++	+

*Примечание:* МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина.

На основании полученных данных можно резюмировать о наименьшей биологической активности наночастиц с оболочками из полилактида и альбумина. При этом с учетом способности наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида снижать уровень активных форм кислорода (АФК), данный вид наночастиц представляет особый интерес в качестве средства адресной доставки лекарств.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 4-Й ГЛАВЫ**

*Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science*

1. Влияние наночастиц на основе оксида железа, модифицированных различными оболочками, на генерацию активных форм кислорода стимулированными клетками крови человека в условиях *in vitro* / Я.Г. Торопова, М.Н. Горшкова, Д.С. Моторина, Д.В. Королев, Ю.А. Скорик, Г.А. Шульмейстер, Е.Ю. Подъячева, А.Я. Багров // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2021. № 4, Т. 57. С. 310-319 (ИФ РИНЦ - 0.370, WoS).

2. Получение и характеристика магнитных наночастиц с оболочкой из полилактида, полисахарида и альбумина / Я.Г. Торопова, Ю.П. Бельский, Н.В. Бельская, Д.В. Королев, И.А. Зелинская, Н.М. Егорова, Д.В. Мухаметдинова, С.Г. Журавский // Вестник новых медицинских технологий [электр. изд.]. 2021. № 3. Doi: 10.24412/2075-4094-2021-3-3-4 (ИФ РИНЦ - 0.469).

3. Генерация активных форм кислорода клетками цельной крови человека при воздействии наночастиц на основе оксида железа, покрытых различными оболочками / Я.Г. Торопова, Д.С. Моторина, И.А. Зелинская, Д.В. Королев, Г.А. Шульмейстер, Ю.А. Скорик // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. № 1, Т. 171. – С. 95-99. DOI: [10.1007/s10517-021-05176-6](https://doi.org/10.1007/s10517-021-05176-6) (ИФ РИНЦ - 0.319, Scopus, WoS).

4. Влияние внутривенного введения крысам наночастиц магнетита с различными оболочками на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус / Я.Г. Торопова, Д.С. Моторина, М.Н. Горшкова, К.Г. Гареев, Д.В. Королев, А.А. Мужикян // Трансляционная медицина. - 2020. - № 2, Т. 7. - С. 52-64 (ИФ РИНЦ-0.382).

5. Albumin Covering Maintains Endothelial Function upon Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Intravenous Injection in Rats / Y.G. Toropova, I.A. Zelinskaya, M.N. Gorshkova, D.S. Motorina, D.V. Korolev, F.S. Velikonivtsev, K.G. Gareev // Journal of Biomedical Materials Research: Part A. – 2021. – V. 109 (10). – P. 2017-

2026 DOI: [10.1002/jbm.a.37193](https://doi.org/10.1002/jbm.a.37193) (Scopus).

*Публикации в других изданиях*

6. Влияние внутривенного введения крысам наночастиц магнетита с различными оболочками на функциональное состояние эндотелия и на антиоксидантный статус / Д.С. Моторина, М.Н. Горшкова, К.Г. Гареев, Д.В. Королев, *Я.Г. Торопова* // Трансляционная медицина: Алмазовский молодежный медицинский форум-2020 (Санкт-Петербург, 21 - 23 мая 2020 г). Санкт-Петербург, 2020. С. 344.

7. Синтез наночастиц магнетита с полисахаридной оболочкой для магнитоуправляемой доставки лекарств / К.Г. Гареев, Д.В. Королев, В.Н. Постнов, В.С. Пугач, *Я.Г. Торопова* // Четвёртый Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике: сб. тезисов докладов (23-26 сент.2018, Новый Свет, Крым, Россия). – Новый Свет, 2018. - С. 115.

8. Fluorescence imaging of the nanoparticles modified with indocyanine green: Poster / D.V. Korolev, *Y G. Toropova*, V.N. Postnov, K.G. Gareev, K.Y. Babikova, N. A. Pechnikova, G. V. Papayan // 4th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures Saint Petersburg OPEN 2017. (Saint Petersburg, April 3-6). 2017.



## **ГЛАВА 5 – ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ КОНЦЕПЦИИ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМОЙ ДОСТАВКИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (СТЕНДОВЫЕ УСЛОВИЯ, EX VIVO, IN VIVO)**

### **5.1 - Экспериментальное подтверждение концепции магнитоуправляемой доставки магнитных наночастиц оксида железа (стендовые условия, ex vivo, in vivo)**

Широкое распространение в последние десятилетия получило использование постоянных магнитов на основе сплава Ne-Fe-B в самых разнообразных областях человеческой деятельности [64]. Мощное магнитное поле, создаваемое миниатюрными магнитами, делает данный тип постоянных магнитов одним из самых востребованных и удобных для применения, в том числе в медицинских разработках. В рамках исследований, касающихся магнитоуправляемой доставки лекарственных средств, встаёт вопрос об определении оптимальных характеристик (геометрических параметров) постоянных магнитов. С помощью численных расчетов, выполненных для магнитов со следующими геометрическими характеристиками (длина вдоль оси – диаметр цилиндрика): 0,5x2 мм, 2x2 мм, 3x2 мм, 5x2 мм, было определено, что наиболее сильное поле создаётся магнитом в аксиальном направлении, с торца цилиндра. При этом эффективный радиус действия сопоставим с геометрическими размерами самого магнита. В магнитах, где длина цилиндра больше его диаметра, наблюдается наиболее сильное поле в аксиально-радиальном направлении (для соответствующих компонент), поэтому цилиндры с большим аспектным отношением (диаметр к длине) следует использовать как наиболее эффективные для адсорбции МНЧ.

Хирургические стенты нашли широкое применение в самых разнообразных методиках лечения сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [338, 345]. Обычно стент представляет из себя металлическую

или пластиковую конструкцию, обладающую определёнными свойствами. Широкое распространение получили стенты из нитинола. Свойства нитинола, такие, как высокая эластичность и эффект памяти формы конструкции, позволяют использовать данные стенты в широком диапазоне хирургических операций [56]. Кроме того, стенты могут быть использованы как каркасные конструкции, в узлах которых могут быть размещены магнитные элементы. В данном случае возникает необходимость к определению магнитных свойств самих стентов из нитинола.

Для определения магнитных свойств хирургических стентов из нитинола были взяты стандартные образцы двух видов (из толстой проволоки и тонкой проволоки). Результаты измерений приведены в таблице 38. Магнитные свойства нитиноловых стентов, если сами конструкции стентов не являются массивными, будут проявляться слабо. В отсутствии экстремально сильного магнитного поля и низких температур магнитная восприимчивость материала стентов небольшая ( $\sim 10^{-6}$ ), поэтому можно пренебречь влиянием стента на магнитные характеристики ассоциированной системы «стент-постоянный магнит».

**Таблица 38 - Магнитная восприимчивость материала хирургических стентов из нитинола**

Образец	Магнитная восприимчивость, $\times 10^{-6}$
1-ый образец (тонкая проволока стента)	$6,0 \pm 0,1$
2-ый образец (толстая проволока стента)	$3,6 \pm 0,2$

Для изучения эффективности концентрирования наночастиц в целевой области и установления характера их поведения в гидродинамических условиях кровеносной системы могут быть использованы специальные гидродинамические модели. При этом в качестве источника магнитного поля могут быть использованы постоянные магниты. Подобные эксперименты позволяют составить первичное представление о возможности реализации

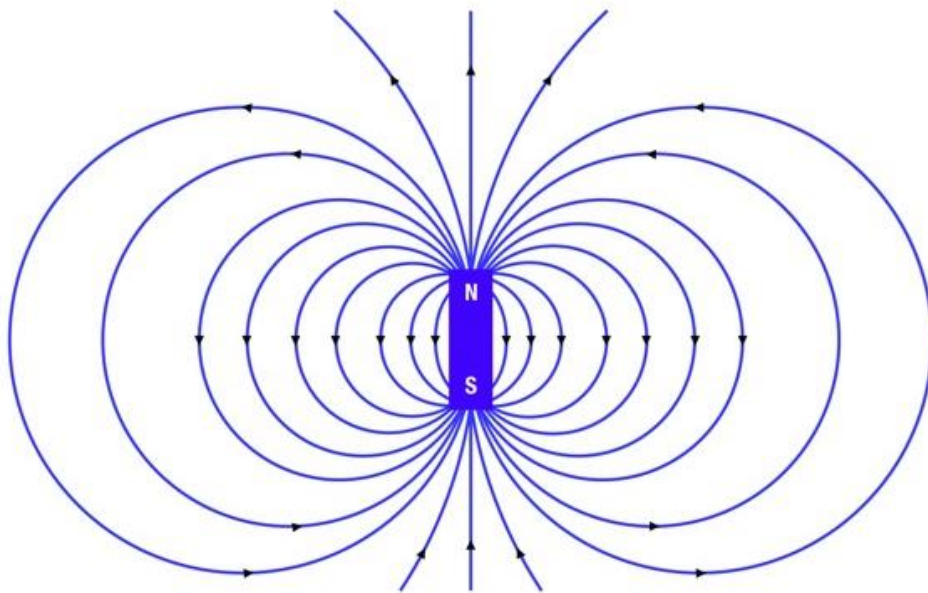
концепции магнитоуправляемого направленного транспорта, основанного на прохождении внутривенно введенных в организм наночастиц через стенку сосуда и их накопление в ткани под воздействием магнитного поля.

В качестве внешнего магнитного поля могут быть использованы постоянные магниты. Если пренебречь магнитостатическим взаимодействием между наночастицами и не рассматривать модель магнитной жидкости, то достаточно оценить взаимодействие между магнитом и отдельной наночастицей в диполь-дипольном приближении.

Поле магнитного диполя (магнитная индукция):

$$B = k \left[ \frac{3(\mathbf{m}\mathbf{r})\mathbf{r}}{r^5} - \frac{\mathbf{m}}{r^3} \right], \quad \text{где} \quad (3)$$

$\mathbf{m}$  – магнитный момент магнита,  $\mathbf{r}$  – радиус-вектор точки, в которой находится наночастица;  $k$  – системный коэффициент. В дипольном приближении поле магнита имеет подобную конфигурацию (рисунк 74):



**Рисунок 74 - Силовые линии поля постоянного магнита**

В однородном магнитном поле наночастица будет только поворачиваться по силовым линиям. В неоднородном магнитном поле на нее будет действовать сила:

$$\mathbf{F} = \left( \mathbf{m}, \frac{\partial B}{\partial l} \right), \text{ где} \quad (4)$$

$\frac{\partial B}{\partial l}$  – производная по заданному направлению  $l$ . Причем сила втягивает наночастицу в область, где поле наиболее неоднородно, т.е. кривизна и густота силовых линий возрастают.

Таким образом, в месте локализации частиц желательно наличие достаточно сильного магнита (или цепочки магнитов), имеющего ярко выраженную осевую анизотропию.

В рамках определения способности отдельных магнитов служить достаточным источником магнитного поля для захвата и удержания МНЧ в сосудистом русле в месте приложения поля (*таблица 39*) показано, что при заданных условиях, если в качестве циркулирующей жидкости выбрана дистиллированная вода, то за 1 час из потока раствора задерживается около 50 % МНЧ. А спустя 2 часа – более 90 %. Если в качестве модельной жидкости выбран аналог плазмы крови – раствор Кребса-Хензеляйта (К-Х), то под действием постоянного магнита задерживается меньше МНЧ, чем за те же временные промежутки, что и с дистиллятом. А спустя 2 часа, в зависимости от длины магнита, задержанными оказываются 70-80% МНЧ.

Таким образом, наиболее эффективное притяжение МНЧ обеспечивают цилиндрические магниты продолговатой формы (длина больше диаметра). При этом область действия магнитного поля сопоставима с геометрическими размерами магнита. Отдельные постоянные неодимовые магниты цилиндрической формы могут служить достаточным источником внешнего магнитного поля для захвата наночастиц магнетита из модельных «сосудов»

гидродинамического стенда, обеспечивая необходимое накопление наночастиц в целевой области.

**Таблица 39 - Количественное определение примагниченных немодифицированных наночастиц оксида железа**

Время, с	Объём вводимых МНЧ, мл	Концентрация МНЧ, мг/мл	Магнит, типоразмер	Скорость потока жидкости, м/с	Используемая жидкость
1800	5	1	3×2	0.3	Раствор Кребса-Хензеляйта
7200	5	1	3×2	0.225	Раствор Кребса-Хензеляйта
7200	5	1	1×1	0.225	Раствор Кребса-Хензеляйта
900	2	1	3×2	0.225	Раствор Кребса-Хензеляйта
900	2	1	3×2	0.225	Дистиллированная вода
900	2	1	1×1	0.225	Раствор Кребса-Хензеляйта
300	2,5	2	5×2	0.225	Дистиллированная вода
900	2,5	2	5×2	0.225	Дистиллированная вода
1800	2,5	2	5×2	0.225	Дистиллированная вода
3600	2,5	2	5×2	0.225	Дистиллированная вода
7200	2,5	2	5×2	0.225	Дистиллированная вода
7200	5	1	5×2	0.225	Раствор Кребса-Хензеляйта

*Примечание:* МНЧ – наночастицы магнетита; М - Масса магнитных наночастиц, определённая спектрофотометрически.

Эксперимент *ex vivo* проводили на гидродинамическом стенде, который состоял из двух внутренних камер, заполненных 120 мл раствора К-Х, помещаемых во внешнюю камеру, выполняющую роль водяной бани.

Во внутренних камерах располагались канюли, на концах которых герметично закрепляли парные изолированные сосуды (сонные артерии крысы). Сами канюли были соединены с трубками, позволяющими обеспечивать замкнутую циркуляцию по сосудам 20 мл раствора К-Х. Над одним из сосудов на расстоянии 1 см располагали неодимовый цилиндрический магнит. В подающийся в сосуды раствор К-Х вводили немодифицированные наночастицы магнетита (МНЧ1) в объеме 0,5 мл и концентрации 0,2 мг/мл. Через 1 час после введения в сосуды МНЧ осуществляли забор раствора К-Х из внутренней камеры. В качестве контроля выступал раствор К-Х, забранный из внутренней камеры, в которой воздействие магнитом не осуществлялось. Концентрацию МНЧ в забранных образцах раствора К-Х определяли спектрофотометрически.

В ходе стендовых испытаний с сосудистым модулем с введением МНЧ при воздействии магнитного поля показано, что использование постоянного цилиндрического магнита обеспечивает прохождение через стенку сосуда 33% от количества МНЧ, введенных в сосуд (*таблица 40*). При этом в контрольной группе накопления МНЧ во внутренней камере не наблюдалось.

**Таблица 40 - Количество прошедших через стенку сосуда крысы наночастиц магнетита под воздействием внешнего магнитного поля при введении в сосуд 0,1 мг наночастиц**

Условия эксперимента	Концентрация МНЧ, мг
Камера с магнитом	0,033±0,004 мг
Камера без магнита	0

*Примечание:* МНЧ- магнитные наночастицы магнетита.

Таким образом, можно сделать вывод об эффективном использовании постоянного магнита из сплава Nd-Fe-B с размерами 10x4 мм, намагниченного вдоль оси, для накопления МНЧ в целевой области в экспериментах на гидродинамическом стенде с модельной системой *ex vivo*. В стендовых

условиях использование постоянного данного магнита способствует прохождению МНЧ через стенку изолированного сосуда крысы.

Поскольку стендовые условия не отражают различные клинические ситуации с наличием в организме патологического процесса, для которого предполагается использование наночастиц, необходимо подтвердить результаты, полученные в стендовых условиях, на животных с моделированием патологий. Для подтверждения возможности использования МНЧ для магнитоуправляемой доставки были проведены исследования *in vivo* на модели опухолевого процесса, выполненной на мышах. Выбор опухолевой модели основывался на том, что характеристики магнитных наночастиц оксида железа (способность к локальному нагреву, возможность их визуализации) определяют данный вид наночастиц как наиболее перспективных для разработки multifunctional систем адресной доставки цитостатических препаратов к опухолям. Мышам с опухолевым процессом в области бедра осуществляли однократное внутривенное введение наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида (как один из видов наночастиц, обладающих наибольшей биосовместимостью), конъюгированных с флуоресцентным красителем индоцианином зеленым (ИЦЗ) (для возможности визуализации наночастиц с помощью флуоресцентной томографии). Воздействие магнитным полем осуществляли посредством имплантированного до начала эксперимента магнита в непосредственной близости к опухоли. В качестве сравнения использовались животные с опухолевым процессом, но без имплантации магнита. Для вычитания фонового свечения использовали интактное животное. Осуществляли внутривенное введение 0,1 мл МНЧ в концентрации 0,7 мг/мл. Оценку накопления наночастиц осуществляли через 1 и 15 минут после внутривенного введения.

Через 1 мин после введения ИЦЗ-МНЧ при отсутствии магнитного поля (группа ИЦЗ-МНЧ+опухоль-БМ) отмечало сь преимущественное накопление ИЦЗ-МНЧ в печени, увеличивающееся со временем (*рисунок 75 А, Б, таблица*

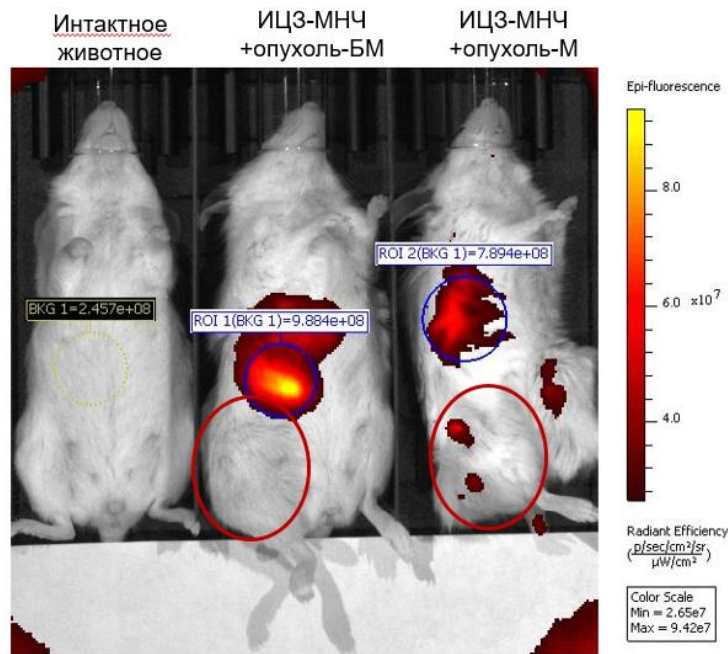
41). Через 1 минуту после внутривенного введения ИЦЗ-МНЧ в условиях воздействия магнитным полем (группа ИЦЗ-МНЧ+опухоль+М) также наблюдалось преимущественное накопление наночастиц в печени, однако в меньшей степени по сравнению с животным, которым введение МНЧ осуществлялось при отсутствии магнитного поля. В динамике наблюдения интенсивность свечения в печени животных группы ИЦЗ-МНЧ+опухоль+М не изменялась (*рисунок 75 Б*).

В области воздействия магнитного поля (участок локализации опухоли) наблюдалось существенное накопление ИЦЗ-МНЧ (*рисунок 76*), при этом накопление ИЦЗ-МНЧ, но меньшее по интенсивности, наблюдалось и у животного, которому вводился ИЦЗ-МНЧ в отсутствие магнитного поля, за счет реализации пассивной направленной доставки.

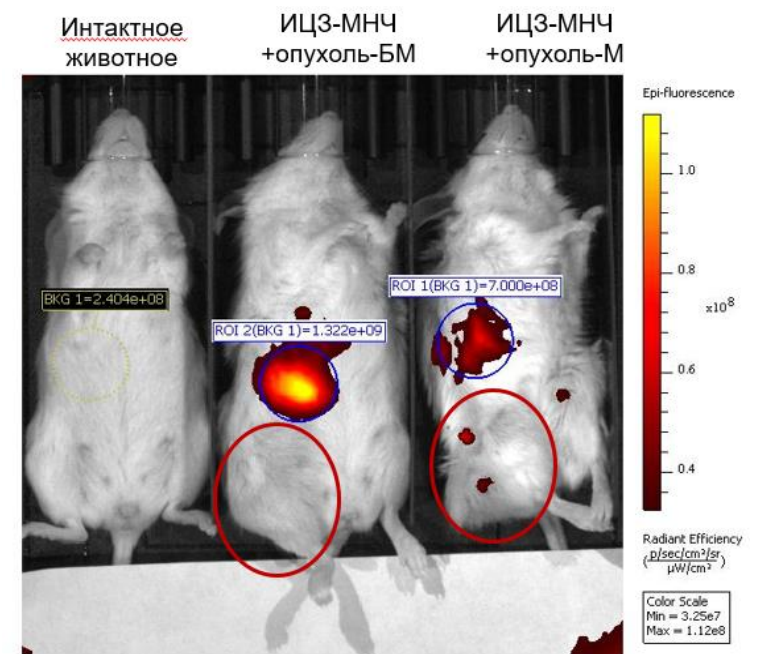
Для наглядности этого процесса был снят профиль средней световой отдачи в горизонтальном сечении (*рисунок 77 А,Б*), который подтвердил накопление ИЦЗ-МНЧ в зоне опухоли без воздействия магнитного поля и значительно более выраженный эффект накопления ИЦЗ-МНЧ в опухоли при использовании магнита.



А.

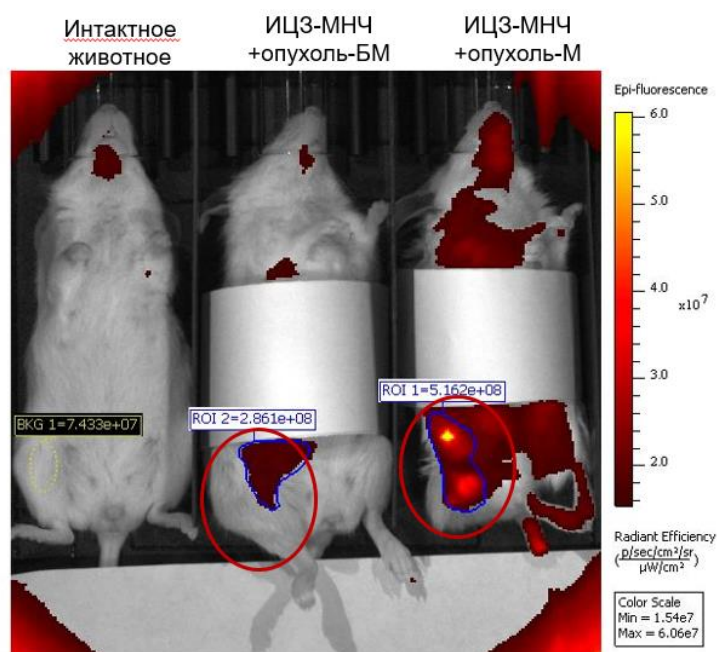


Б.



**Рисунок 75 - Динамика флуоресценции наночастиц с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым при их однократном внутривенном введении мышам с опухолевым процессом (участок локализации опухоли выделен окружностью)**

*Примечание:* ИЦЗ-МНЧ – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым; ИЦЗ-МНЧ+опухоль-БМ – группа животных с опухолевым процессом с введением наночастиц при отсутствии магнитного поля; ИЦЗ-МНЧ+опухоль-М – группа животных с опухолевым процессом с введением наночастиц при наличии магнитного поля. А. Интенсивность флуоресценции печени через одну минуту после введения; Б. печени через 15 минут после введения.



**Рисунок 76 - Интенсивность флуоресценции наночастиц с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым при их однократном внутривенном введении мышам с опухолевым процессом в опухоли через 15 минут после введения (участок локализации опухоли выделен окружностью)**

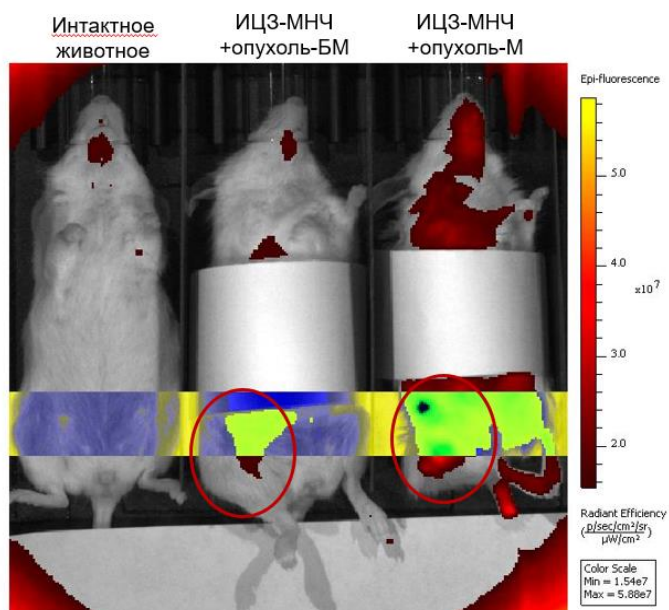
*Примечание:* ИЦЗ-МНЧ – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым; ИЦЗ-МНЧ+опухоль-БМ – группа животных с опухолевым процессом с введением наночастиц при отсутствии магнитного поля; ИЦЗ-МНЧ+опухоль-М – группа животных с опухолевым процессом с введением наночастиц при наличии магнитного поля. Для исключения засветки флуоресценцией печени сигнала вторичного излучения от опухоли область печени была экранирована белой бумагой).

**Таблица 41 - Динамика интенсивности свечения в печени и опухоли после внутривенно введенных мышам наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым,  $\frac{p/s}{\mu W/cm^2}$**

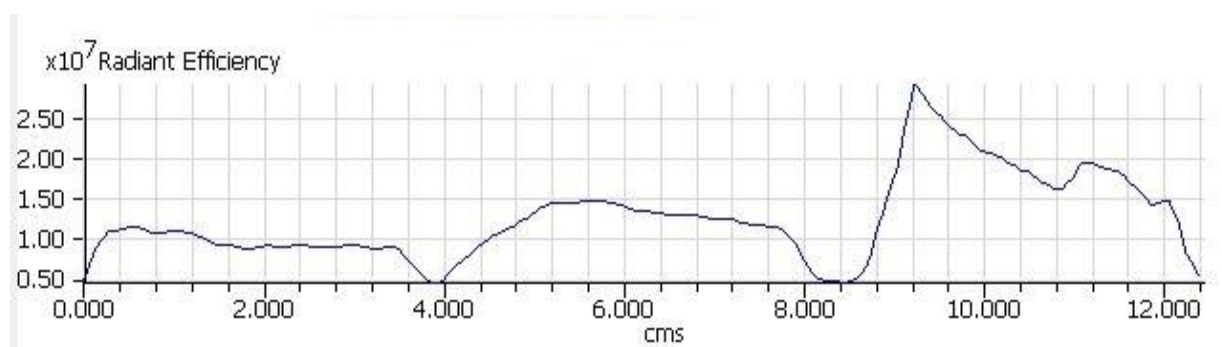
Время, мин	Без имплантации магнита		С имплантацией магнита	
	печень	опухоль	печень	опухоль
1	$9,9 \pm 0,7 \times 10^8$	0	$7,9 \pm 0,4 \times 10^8$	0
15	$1,3 \pm 0,4 \times 10^9$ <sup>@</sup>	$2,9 \pm 0,2 \times 10^8$	$7,0 \pm 0,5 \times 10^8$ <sup>#</sup>	$5,2 \pm 0,7 \times 10^8$ <sup>#</sup>

*Примечание:* <sup>@</sup>P<0,05 по сравнению с 1-ой минутой после введения; <sup>#</sup>P<0,05 по сравнению со значениями эксперимента без имплантации магнита

А.



Б.



**Рисунок 77 - Интенсивность флуоресценции в опухоли через 15 минут после введения мышам наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым**  
*Примечание:* А. Сечение горизонтальной карты измерения флуоресценции; Б. Световая отдача в горизонтальном сечении.

Таким образом, при внутривенном введении МНЧ+полилактид мышам с опухолевым процессом происходит пассивное накопление наночастиц в опухоли, усиливающееся при воздействии постоянным магнитным полем, что подтверждает возможность использования данного вида МНЧ для магнитоуправляемой доставки лекарств.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 5-Й ГЛАВЫ**

*Перечень публикаций, индексируемых в Международных базах данных Scopus*

1. Controlling the movement of magnetic iron oxide nanoparticles intended for targeted delivery of cytostatics / Ya.G. Toropova, D.V. Korolev, M.S. Istomina, G.A. Schulmeister, A.V. Petukhov, V.I. Mishanin, A.N. Gorshkov, E.Yu. Podyacheva, K.G. Gareev, A.Ya. Bagrov, O.N. Demidov // International Journal of Nanomedicine. 2021. Vol. 16. P. 5651 – 5664 DOI: [10.2147/IJN.S318200](https://doi.org/10.2147/IJN.S318200) (*Scopus*).

*Публикации в других изданиях*

2. Глава: Магнитоуправляемая доставка цитостатиков / Я.Г. Торопова, И.А. Зелинская, Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза // Трансляционная медицина. Санкт-Петербург, 2020. - С. 137-154.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нanomатериалы на сегодняшний день активно используются для решения различных биомедицинских задач (диагностика, лечение различных заболеваний) на сегодняшний день является одним из приоритетных научных направлений. Особый интерес в широком спектре наночастиц, предполагаемых для использования в биомедицине, представляют магнитные наночастицы (наноразмерные частицы оксида железа, МНЧ). Это связано с их уникальными химическими, биологическими и магнитными характеристиками, обеспечивающими их многофункциональность. МНЧ могут быть сконцентрированы в определенном участке с помощью применения магнитного поля, обеспечивая тем самым целевую доставку фармакологических агентов. Кроме того, МНЧ могут быть использованы в качестве теплогенерирующих систем для гипертермического воздействия на опухоль – магнитной гипертермии, а также существует возможность их использования в качестве контрастирующего агента при магнитно-резонансной томографии [61, 130, 196, 358]. Данный вид наночастиц является перспективным агентом в рамках концепции тераностики, подразумевающей сочетание мультимодальной визуализации и комбинированных терапевтических подходов [225]. Для обеспечения своей функциональной пригодности в качестве средства магнитоуправляемой доставки магнитные наночастицы должны соответствовать определенным условиям, включающим их способность образовывать в биосовместимых растворителях устойчивую коллоидную систему, обладать высокой биосовместимостью и способностью к преобразованию в организме с элиминацией в виде нетоксичных продуктов. Для наночастиц должны быть изучены закономерности их распределения в организме при варианте введения, планируемом при их применении в клинических условиях. На самом раннем этапе разработки наночастиц как средства адресной доставки необходимо исследовать их эффекты в отношении потенциальных органов/тканей-мишеней. При этом необходим анализ

взаимосвязи оказываемых эффектов наночастиц в организме с их ключевыми характеристиками: гидродинамический размер, форма, заряд и другие свойства поверхности и т.д. Кроме того, наночастицы должны характеризоваться отсутствием намагниченности после прекращения воздействия магнита и обладать адекватной магниточувствительностью (то есть обладать достаточно большим магнитным моментом) [179]. Для эффективного удержания наночастиц в конкретном участке магнитные силы притяжения, оказывающие на них влияние, должны преодолевать создаваемые кровотоком силы сопротивления. Подтверждение в эксперименте возможности селективного накопления наночастиц в участке локализации опухоли позволит создать основу для разработки системы адресной доставки цитостатических препаратов.

В настоящей работе предложена концепция магнитоуправляемой доставки лекарственных препаратов, включающая магнитные наночастицы на основе оксида железа (выступающих в роли носителя лекарства), а также средство для управления их перемещением в организме. В качестве последнего может использоваться как внешнее магнитное поле, так и магнитные имплантанты, помещаемые в организм в непосредственной близости к участку, пораженному опухолевым процессом. В качестве имплантантов предложено применять постоянные неодимовые железо-борные магниты, что обеспечивает увеличение глубины достигаемого магнитного поля до 10–15 см [320]. Подобный подход, основанный на имплантации материалов с магнитными свойствами для адресной доставки лекарственных препаратов, ассоциированных с магнитными носителями, уже описан в литературе [315, 317]. При этом продемонстрировано, что использование имплантантов обуславливает увеличение силы магнитного воздействия на магнитные наночастицы [48, 91]. Также возможно использование стента в качестве средства управления перемещением магнитных наночастиц в организме, представляющего собой упругий металлический каркас, который помещается в пораженные опухолевым процессом полые органы для

обеспечения их проходимости. При этом направленность воздействия реализуется за счет магнитного поля, создаваемого стентом, а также за счет тропности магнитных наночастиц к пораженным опухолью тканям, характеризующихся повышенной проницаемостью сосудов. Данный подход может быть успешно применён у онкологических пациентов со злокачественными новообразованиями полых органов, прежде всего, дыхательной и пищеварительной систем (поскольку именно в этих органах наиболее востребована установка полых стентов. Также возможен вариант применения внешнего магнитного поля, который характеризуется ограничениями по локализации опухоли, которая должна располагаться в максимальной близости к поверхности тела.

Для разработки такого подхода необходимо иметь полное представление о системном влиянии наночастиц, а также о механизмах их взаимодействия с отдельными биологическими структурами. При этом каждый последующий этап фармакологической (химической) разработки наночастиц должен проводиться параллельно с анализом их профиля биосовместимости.

В связи с этим, на начальном этапе работы было исследовано влияние немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа, синтезированных различными способами и обладающими различными физико-химическими характеристиками, на эндотелиальные клетки человека, являющимися первой мишенью при попадании наночастиц в кровоток. Было обнаружено, что наночастицы, синтезированные различными способами, оказывают в их отношении различный по выраженности эффект. Так, наночастицы с ядром из диоксида кремния оказывали наибольший цитостатический эффект, выражающийся в виде снижения жизнеспособности клеток, в то время как наночастицы магнетита и композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния обладали наилучшим профилем биосовместимости. В качестве дополнительного теста, направленного на оценку безопасности наночастиц, выступила оценка динамики показателей

периферической крови крыс при однократном внутривенном введении наночастиц. Было отмечено, что однократное внутривенное введение всех видов наночастиц в дозе 0,7 мг не обеспечивает проявлений острой системной токсичности в виде изменений показателей периферической крови крыс.

Данный этап работы позволил определить кандидаты для дальнейшей разработки наночастиц как средства адресной доставки.

В следующие серии экспериментов, составляющих этап работы, посвященный детальному исследованию эффектов наночастиц при их внутривенном введении, были включены два вида наночастиц: наночастицы магнетита и композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. В различных экспериментальных протоколах (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) исследовано влияние данных видов наночастиц на основные физиологические процессы и системы.

Так, в условиях инкубации наночастиц с цельной кровью человека была исследована генерация активных форм кислорода (АФК), агрегация и гемолиз эритроцитов. Было определено, что наночастицы магнетита и композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния дозозависимо снижали спонтанную хемилюминесценцию (ХЛ) цельной крови и степень агрегации эритроцитов, при этом с увеличением времени воздействия наночастиц эффект снижения ХЛ усиливался. Максимальный эффект в отношении снижения выработки АФК обеспечивали композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. В отношении снижения степени агрегации эритроцитов наночастицы магнетита обеспечивали более выраженный эффект. В условиях взаимодействия наночастиц с плазмой крови, на поверхности всех видов наночастиц происходило формирование белкового слоя, состав которого не зависел от поверхностных характеристик наночастиц и был представлен альбумином.

Отдельное исследование было направлено на оценку влияния наночастиц магнетита и композитных наночастиц на функциональное состояние эндотелия при их внутривенном введении с оценкой сократительной



и релаксационной функции сосудов. Продемонстрировано отсутствие влияния внутривенного введения композитных наночастиц на сокращение и релаксацию мезентериальных сосудов, тогда как введение наночастиц магнетита обеспечивало изменения сократительной активности сосудов.

Эксперимент, посвященный исследованию вазомоторных реакций, системной гемодинамики и микроциркуляции у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока на фоне введения наночастиц магнетита позволил выявить, что в условиях изменяющейся скорости кровотока внутривенное введение крысам наночастиц данного вида не вызывает нарушений со стороны центральной гемодинамики, а также механизмов регуляции тканевого кровотока, сократительной и релаксационной способности бедренной артерии, вызывая при этом снижение релаксационной способности и усиление сократительной активности брыжеечной артерии.

В отдельных сериях экспериментов также были исследованы закономерности органного распределения наночастиц магнетита и композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния при их внутривенном введении. Выявлено, что данные виды наночастиц характеризовались равнозначным накоплением в печени, селезенке и почках.

В разрезе дальнейшего внедрения использования наночастиц в клиническую практику отдельные эксперименты были направлены на получение информации о влиянии однократного и многократного внутривенного введения наночастиц магнетита и композитных наночастиц на базовые физиологические параметры и на показатели системы гемостаза крыс. Было обнаружено, что однократное внутривенное введение крысам данных видов наночастиц в дозе 400,0 мг/кг вызывает изменения интегральных параметров, воспалительный процесс, повреждение почек и печени, а также гипокоагуляционный сдвиг. При этом однократное введение композитных наночастиц вызывало большие по выраженности нарушения. При многократном внутривенном введении крысам наночастицы приводят к дозозависимым нарушениям физиологических показателей,

характеризующихся изменениями интегральных параметров, наличием воспаления. При этом композитные наночастицы в меньшей дозе (10,0 мг/кг) оказывают схожие по выраженности и характеру эффекты с наночастицами магнетита в дозе 30,0 мг/кг. Показано, что многократное внутривенное введение крысам наночастиц магнетита не влияет на параметры свертывания крови, в то время как введение композитных наночастиц приводит к гипокоагуляционному сдвигу.

Также для вышеуказанных видов наночастиц были проведены исследования *in vivo* и *ex vivo* в условиях наличия магнитного поля, посвященные исследованию центральной гемодинамики и уровней органной перфузии при внутривенном введении наночастиц, оценке сократительной активности изолированного сердца крысы в условиях воздействия наночастиц. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что внутривенное введение крысам наночастиц при наличии воздействия внешнего магнитного поля не вызывает существенных изменений параметров центральной гемодинамики и микроциркуляции на уровне отдельных органов, при этом введение наночастиц в изолированное сердце в условиях наличия магнитного поля обеспечивает их равнозначное накопление в миокарде и снижение сократительной активности сердец.

Анализ полученных результатов позволил сделать выбор в пользу наночастиц магнетита для использования в следующих сериях экспериментов с модификацией их поверхности и исследованием их биосовместимости. При этом полученные на данном этапе исследования результаты могут явиться основой для разработки подходов адресной доставки фармакологических агентов с помощью немодифицированных магнитных наночастиц на основе оксида железа с их внутривенным введением.

Следующий этап исследования был направлен на исследование патофизиологических эффектов наночастиц магнетита, модифицированных различными оболочками. Предварительно наночастицы с оболочками из

полилактида, полисахарида и альбумина были охарактеризованы по их физико-химическим характеристикам.

В условиях с внутривенным введением наночастиц крысам была исследована морфология и функциональная активность артериальных сосудов брыжейки. Было установлено, что однократное внутривенное введение крысам не обеспечивали морфологических изменений мезентериальных сосудов, при этом наночастицы с оболочкой из полисахарида снижали их эндотелий-зависимое расслабление.

Также было проведено экспериментальное исследование в условиях *in vivo* с исследованием дозозависимых эффектов наночастиц при их внутривенном введении с оценкой базовых физиологических параметров, которое позволило определить органотоксичность наночастиц. Так, введение наночастиц с оболочками из полисахарида характеризовалось развитием признаков гепатотоксичности, в то время введение наночастиц с оболочкой из альбумина вызывало развитие пульмонотоксических эффектов.

В условиях *in vitro* была проведена сравнительная оценка выработки активных форм кислорода (АФК) в динамике взаимодействия модифицированных различными оболочками наночастиц с клетками крови человека. Определено, что наночастицы с оболочкой из полисахарида вызывали дозо- и времязависимое нарастание эффекта в виде повышения спонтанной хемилюминесценции (ХЛ), тогда как наночастицы с оболочкой из полилактида снижали спонтанную хемилюминесценцию. В условиях индуцированной ХЛ наночастицы с оболочкой из полилактида также обеспечивали снижение ХЛ.

Проведенные в ходе данного этапа исследования позволили обосновать выбор оболочки магнитных наночастиц оксида железа, обеспечивающей наилучший профиль их биосовместимости (наночастицы с оболочкой из полилактида и альбумина).

В рамках разработки и подтверждения концепции магнитоуправляемой доставки лекарств на основе магнитных наночастиц был проведен ряд экспериментов в различных условиях.

Так, были изучены магнитные свойства нитиноловых стентов, а также проведен математический расчет оптимальных геометрических характеристик магнитов, которые предполагаются к использованию в качестве имплантантов для обеспечения управления перемещением в организме наночастиц. Было установлено, что магнитными свойствами стентов можно пренебречь.

При этом способность отдельных магнитов с рассчитанными характеристиками служить достаточным источником магнитного поля для захвата и удержания наночастиц была подтверждена в стендовых условиях на экспериментальном стенде, моделирующем сосудистую систему. Было показано, что в случае циркуляции в системе раствора, являющегося аналогом плазмы крови, воздействие магнита обеспечивает эффективное накопление наночастиц в участке приложения магнита. Во второй серии экспериментов использовали модифицированный вариант данного стенда, позволяющий произвести оценку накопления наночастиц под действием магнитного поля, проходящих через стенку изолированного сосуда. Было показано, что воздействие магнита позволяет обеспечить накопление наночастиц магнетита в участке воздействия магнита.

Выбранный вариант модифицированных наночастиц в отдельной серии экспериментов был успешно апробирован в рамках подтверждения эффективности магнитоуправляемой доставки наночастиц в опухолевую ткань. Полученные в ходе данного исследования результаты продемонстрировали эффект пассивной доставки наночастиц, а также повышение накопления наночастиц в участке локализации опухоли при воздействии магнита, имплантированного в непосредственной близости к опухоли. Данный факт позволил сделать вывод об эффективности магнитоуправляемой доставки наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида к опухоли.

Таким образом, немодифицированные наночастицы магнетита и модифицированные наночастицы магнетита с оболочками из полилактида и альбумина могут быть использованы для применения в тераностике в качестве многофункциональных систем магнитоуправляемой доставки.

## ВЫВОДЫ

1. В условиях *in vitro* исследуемые виды немодифицированных магнитных наночастиц оксида железа обладают дозозависимым цитотоксическим эффектом в отношении эндотелиоцитов человека; наилучшим профилем биосовместимости обладают наночастицы магнетита по сравнению с композитными наночастицами с оболочкой или ядром из диоксида кремния.

2. При взаимодействии с кровью человека в условиях *in vitro* немодифицированные наночастицы вызывают дозозависимый гемолиз эритроцитов, усиливающийся с течением времени воздействия.

3. Немодифицированные наночастицы различного качественного состава на основе оксида железа при их однократном и многократном внутривенном введении крысам оказывают многообразные эффекты на физиологические параметры организма, выраженность которых зависит от локальных гемодинамических условий, качественного состава наночастиц и использованных доз; наименьшими повреждающими эффектами обладают наночастицы магнетита.

4. Внутривенное введение наночастиц магнетита приводит к снижению сократительной активности сосудов в интактных условиях, тогда как в условиях изменяющейся скорости кровотока сосудистые эффекты внутривенного введения данного вида наночастиц отличаются в различных сосудистых регионах, при этом наблюдаемое снижение релаксационной и повышение сократительной активности сосудов брыжейки в условиях воздействия наночастиц магнетита не вызывают нарушений на уровне центральной гемодинамики и механизмов регуляции тканевого кровотока.

5. В условиях наличия магнитного поля внутривенное введение крысам немодифицированных наночастиц не оказывает значимого влияния на системную гемодинамику и органную микроциркуляцию, несмотря на выявленное снижение сократительной активности изолированных сердец при воздействии наночастиц.

6. Общими патофизиологическими эффектами внутривенного введения крысам всех видов наночастиц магнетита, покрытых полимерными органическими оболочками, являются изменение физиологического ответа на тактильные и болевые раздражители, морфологические изменения печени и легких; наночастицы магнетита, покрытые оболочкой из полисахарида, также снижают релаксационную функцию сосудов.

7. Одним из механизмов реализации выявленных повреждающих эффектов наночастиц с оболочкой из полисахарида является значительное повышение уровня активных форм кислорода в цельной крови; тем не менее, наночастицы магнетита с оболочкой полилактида, также обладая повреждающими эффектами, снижают уровень активных форм кислорода в интактных условиях, а также в условиях индуцированного окислительного стресса.

8. Внутривенное введение наночастиц магнетита с оболочкой из полисахарида снижает способность артерий к релаксации, не влияя при этом на их сократительную активность.

9. Использование постоянного магнита способствует прохождению немодифицированных наночастиц магнетита через стенку изолированного сосуда крысы, что подтверждает возможность реализации магнитоуправляемой доставки лекарств с помощью данного вида наночастиц к поврежденным тканям.

10. При внутривенном введении магнитных наночастиц с оболочкой из полилактида в условиях действия постоянного магнитного поля, создаваемого магнитным имплантом, происходит усиление их накопления в опухолевой ткани. При этом на фоне использования магнита выявлено значительное снижение накопления наночастиц в печени, что может быть важно для увеличения их биодоступности для ткани-мишени. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования данного вида наночастиц для магнитоуправляемой адресной доставки цитостатических препаратов в опухоль.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Немодифицированные наночастицы магнетита и наночастицы магнетита, модифицированные оболочками из полилактида и альбумина могут быть использованы для применения в тераностике в качестве многофункциональных систем магнитоуправляемой доставки.

2. Разработанный в ходе работы гидродинамический стенд может быть использован для исследования проницаемости стенок сосудов для магнитных наночастиц под воздействием внешнего магнитного поля.



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. 15 лет клинического применения «магневиста» - первого магнитно-резонансного контрастного средства / Л.А. Тютин, Н.Л. Шимановский, Т.Н. Трофимова, и др. // Мед. визуализация. – 2004. – Т. 3. – С. 125–34.
2. Альмяшев, В.И. Исследование структуры, элементного и фазового состава композитных слоев Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> методами растровой электронной микроскопии, рамановской спектроскопии и тепловой десорбции азота / В.И. Альмяшев, К.Г. Гареев, С.А. Ионин // ФТТ. – 2014. – Т. 56. – С. 2086-2090.
3. Взаимодействие магнитных наночастиц с клетками / С.П. Туранская, А.П. Кусяк, В.В. Туров, П.П. Горбик // Медико- биологические проблемы поверхности. – 2013. – Т. 5, № 20. – С. 227-246.
4. Владимиров, Ю.А. Свободные Радикалы И Клеточная Хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи Биологической Химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
5. Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мышцы при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> / И.В. Мильто, Г.А. Михайлов, А.В. Ратькин, и др. // Бюл. сиб. медицины. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 32-36.
6. Влияние наночастиц железа на дыхательную функцию крови / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Е.А. Сладкова, и др. // Ярославский педагогический вестник. – 2010. – Т. 3. – С. 75-79.
7. Влияние наночастиц магнетита на гемореологические показатели / А.Г. Гуцин, С.В. Полулях, Н.А. Мурашова, и др. // Ярославский педагогический вестник. – 2011. – Т. 3, № 1. – С. 89-93.
8. Гемосовместимость n-карбоксиацильных производных / Д.Л. Сонин, Ю.А. Скорик, Л.В. Васина, и др. // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3 (2). – С. 80-88.
9. Значение HER-2/NEU при раке желудка / А.Н. Луд, Ю.В. Вахабова, Н.Н. Семенов, и др. // Современная онкология - 2010. - № 2, Т. 12. – С. 54-56.

10. Карр Я. Макрофаги: обзор ультраструктуры и функции: пер. с англ. / Я.Карр. - Москва: Медицина, 1978. – 189 с.
11. Киселёв, Д.Ф. Электричество и магнетизм. Методика решения задач: учебное пособие / Д.Ф. Киселёв, А.С. Жукарев, С.А. Иванов; Физический факультет МГУ. – Москва, 2018. – С. 608.
12. Кляритская, И.Л. Оценка качества жизни и частоты встречаемости побочных эффектов при проведении химиотерапии у больных раком молочной железы и раком яичников / И.Л. Кляритская, Е.В. Максимова // Молодой ученый. – 2012. – Т. 12, № 47. – С. 551-555.
13. Лебедев, С.В. Референтные значения химических элементов в теле лабораторных животных / С.В. Лебедев, О.В. Кван // Микроэлементы в медицине. – 2014. – Т. 15(2). – С. 34–39.
14. Магнитные наноконпозиты  $MgFe_2O_4/SiO_2$  типа ядро/оболочка для биомедицинских применений: синтез и свойства / А.С. Камзин, Н. Das, N. Wakiya, А.А. Валиуллин // Физика Твёрдого Тела. – 2018. – Т. 60, № 9. – С. 1707.
15. Магнитные наночастицы Cu/Fe с противоопухолевой активностью / О.В. Бакина, Е.А. Глазкова, Н.В. Сваровская, и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 19-25.
16. Миронов, А. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты) / А. Миронов. - Москва: Гриф и К°, 2012. – 944 с.
17. Модификация макрофагов и моноцитов человека магнитными наночастицами *in vitro* для доставки, опосредованной клетками / Н.А Перекуча, П.А. Смолина, А.М. Дёмин, и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – Т. 19, № 4. – С. 143-150.
18. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов / В.Н. Постнов, Е.Б. Наумышева, Д.В. Королев, М.М. Галагудза // Биотехносфера. – 2013. – Т. 6, № 30. – С. 16-27.
19. Наночастицы: новый подход в диагностике и терапии глиальных

опухолей головного мозга / И.Ф. Гареев, О.А. Бейлерли, В.Н. Павлов, и др. // Креативная хирургия и онкология. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 66-74.

20. Оценка биораспределения магнитолипосом в опухоли и органах мышцей методом электронного парамагнитного резонанса / Н.А. Марнаутов, В.А. Сереженков, Л.Х. Комиссарова, и др. // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 769-772.

21. Поверхностно модифицированные магнитные наночастицы для медико - биологического применения. Введение Магнитные наночастицы Поверхностная модификация и стабилизация наночастиц для биомедицинского применения / Г.Ю. Васюков, И.В. Митрофанова, В.В. Иванова, В.Д. Прокопьева // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13 (6). – С. 33-40.

22. Сидоров В.В. Метод ЛДФ в оценке взаимосвязанности гемодинамических ритмов микроциркуляторных колебаний кровотока / В.В. Сидоров // Лазерные и информационные технологии в медицине XXI века: материалы междунар. конф. (21 июня 2001г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург, 2001. – С. 500-501.

23. Синтез Магнитных Нанопорошков Оксида Железа – Магнетита И Маггемита / О.А. Шилова, А.М. Николаев, А.С. Коваленко, и др. // Журнал Неорганической Химии. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 398-402.

24. Синтез наночастиц магнетит–золото, имеющих структуру типа ядро–оболочка / П.Г. Рудаковская, Е.К. Белоглазкина, А.Г. Мажуга, и др. // Вестн. моск. ун-та. сер. 2. Химия. – 2015. – Т. 56, № 3. – С. 181-189.

25. Улащик, В.С. Локальная гипертермия в онкологии: использование магнитного поля, лазерного излучения, ультразвука / В.С. Улащик // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2014. – Т. 2. – С. 48-57.

26. Физиологические, Биохимические И Биометрические Показатели Нормы Экспериментальных Животных: справочник / Т.В. Абрашова, Я.А. Гушин, М.А. Ковалева, и др. – Санкт-Петербург: Лема, 2013. – 116 с.

27. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. - 2-е изд., доп. - Москва: Медицина, 2005. – С. 832.
28. A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: A mouse study / S. Balivada, R.S. Rachakatla, H. Wang, et al. // BMC Cancer. – 2010. – Vol. 10 (119). – P. 1-9.
29. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides / A.M.G.C. Dias, A. Hussain, A.S. Marcos, A.C.A. Roque // Biotechnology Advances. – 2011. – Vol. 29, № 1. – P. 142-155.
30. A complex of  $\alpha 6$  integrin and E-cadherin drives liver metastasis of colorectal cancer cells through hepatic angiopoietin-like 6 / S. Marchiò, M. Soster, S. Cardaci, et al. // EMBO Molecular Medicine. – 2012. – Vol. 4, № 11. – P. 1156-1175.
31. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools / S.Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, et al. // International journal of nanomedicine. – 2011. – Vol. 6. – P. 2963-2979.
32. A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications / T. Casalini, F. Rossi, A. Castrovinci, G. Perale // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2019. – Vol. 7. – P. 1-16.
33. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells / B. Baudin, A. Bruneel, N. Bosselut, M. Vaubourdolle // Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2, № 3. – P. 481-485.
34. A Radio-Nano-Platform for T1/T2 Dual-Mode PET-MR Imaging / Y.H. Gholami, H. Yuan, M.Q. Wilks, et al. // International journal of nanomedicine. – 2020. – Vol. 15. – P. 1253-1266.
35. A Review on Metal- and Metal Oxide-Based Nanozymes: Properties, Mechanisms, and Applications / Q. Liu, A. Zhang, R. Wang, et al. // Nano-Micro Letters. – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 1-53.

36. A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles / A.V. Samrot, C.S. Sahithya, J. Selvarani A, et al. // *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. – 2021. – Vol. 4. – P. 1-13.

37. A smart nanoparticle-laden and remote- controlled self-destructive macrophage for enhanced chemo/chemodynamic synergistic therapy / J. Ren, X. Qu, P. Sun, et al. // *ACS Nano*. – 2020. – Vol. 14, № 10. – P. 13894-13904.

38. Accelerated iron oxide nanoparticle degradation mediated by polyester encapsulation within cellular spheroids / B. Mattix, T.R. Olsen, T. Moore, et al. // *Advanced Functional Materials*. – 2014. – Vol. 24, № 6. – P. 800-807.

39. Albumin-coated single-core iron oxide nanoparticles for enhanced molecular magnetic imaging (Mri/mpi) / A. Baki, A. Remmo, N. Löwa, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 6235. – P. 1-19.

40. Albumin and Hyaluronic Acid-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for Biomedical Applications / E. Vismara, C. Bongio, A. Coletti, et al. // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 7. – P. 1-25.

41. Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation / A. Nemmar, S. Albarwani, S. Beegam, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 2279-2789.

42. An implantable smart magnetic nanofiber device for endoscopic hyperthermia treatment and tumor-triggered controlled drug release / A.R.K. Sasikala, A.R. Unnithan, Y.H. Yun, et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2016. – Vol. 31. – P. 122-133.

43. Analysis of nanoparticle delivery to tumours / S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, et al. // *Nature Reviews Materials*. – 2016. – Vol. 1, № 5. – P. 1-12.

44. Anastasia K Hauser, Ronita Mathias, Kimberly W Anderson, J.Z.H. The effects of synthesis method on the physical and chemical properties of dextran coated iron oxide nanoparticles / J.Z.H. Anastasia K Hauser, Ronita Mathias, Kimberly W Anderson // *Materials chemistry and physics*. – 2015. – Vol. 160. – P. 177-186.

45. Anisotropy effects in magnetic hyperthermia: A comparison between spherical and cubic exchange-coupled FeO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles / H. Khurshid, J. Alonso, Z. Nemati, et al. // *Journal of Applied Physics*. – 2015. – Vol. 117, № 17. – P. 1-4.
46. Anselmo, A.C. Nanoparticles in the clinic: An update / A.C. Anselmo, S. Mitragotri // *Bioengineering & Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 4, № 3. – P. 1-16.
47. Anti-HER2 antibody and ScFvEGFR-conjugated antifouling magnetic iron oxide nanoparticles for targeting and magnetic resonance imaging of breast cancer / H. Chen, L. Wang, Q. Yu, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 3781-3794.
48. Application of high gradient magnetic separation principles to magnetic drug targeting / J.A. Ritter, A.D. Ebner, K.D. Daniel, K.L. Stewart // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2004. – Vol. 280. – P. 184-201.
49. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine / Q.A Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2003. – Vol. 36, № 13. – P. R167–R181.
50. Assaraf, Y.G. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment / Y.G. Assaraf, C.P. Leamon, J.A. Reddy // *Drug Resistance Updates*. – 2014. – Vol. 17, № 4-6. – P. 89-95.
51. Assessing cell-nanoparticle interactions by high content imaging of biocompatible iron oxide nanoparticles as potential contrast agents for magnetic resonance imaging / R. Hachani, M.A. Birchall, M.W. Lowdell, et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 1-14.
52. Assessment of zero-valent iron-based nanotherapeutics for ferroptosis induction and resensitization strategy in cancer cells / K.-J. Huang, Y.-H. Wei, Y.-C. Chiu, et al. // *Biomaterials science*. – 2019. – Vol. 7, № 4. – P. 1311-1322.
53. ASTM (2013). ASTM E2524-08(2013) - Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles. West Conshohocken, PA: ASTM International; Available online at:

<https://www.astm.org/Standards/E2524.htm> (accessed September 26, 2018). – URL: [https://www.google.com/search?q=ASTM+\(2013\).+ASTME2524-08\(2013\)+--+Standard+Test+Method+for+Analysis+of+Hemolytic+Properties+of+Nanoparticles.+West+Conshohocken%2C+PA%3A+ASTM+International%3B+A+available+online+at%3A+https%3A%2F%2Fwww.astm.org%2FStandards%2F](https://www.google.com/search?q=ASTM+(2013).+ASTME2524-08(2013)+--+Standard+Test+Method+for+Analysis+of+Hemolytic+Properties+of+Nanoparticles.+West+Conshohocken%2C+PA%3A+ASTM+International%3B+A+available+online+at%3A+https%3A%2F%2Fwww.astm.org%2FStandards%2F) (date accessed: 25.08.2021). – Text : electronic.

54. Au Nanocage Functionalized with Ultra-small Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Targeting T1-T2 Dual MRI and CT Imaging of Tumor / G. Wang, W. Gao, X. Zhang, X. Mei // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 1-10.

55. Ayo, A. Peptide-based strategies for targeted tumor treatment and imaging / A. Ayo, P. Laakkonen // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 1-31.

56. Barras, C.D.J. Nitinol - Its use in vascular surgery and other applications / C.D.J. Barras, K.A. Myers // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. – 2000. – Vol. 19, № 6. – P. 564-569.

57. Biocompatibility and therapeutic evaluation of magnetic liposomes designed for self-controlled cancer hyperthermia and chemotherapy / M. Gogoi, M.K. Jaiswal, H.D. Sarma, et al. // *Integrative Biology (United Kingdom)*. – 2017. – Vol. 9, № 6. – P. 555-565.

58. Biocompatibility and Toxicity of Polylactic Acid/Ferrosiferic Oxide Nanomagnetic Microsphere / H. Xiang, Y. Mu, C. Hu, X. Luo // *Journal of Nanomaterials*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-8.

59. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection / H. Gu, K. Xu, C. Xu, B. Xu // *Chemical Communications*. – 2006. – Vol. 7 (9), № 9. – P. 941-9.

60. Bioinspired “active” Stealth Magneto-Nanomicelles for Theranostics Combining Efficient MRI and Enhanced Drug Delivery / K.L. Zhang, J. Zhou, H. Zhou, et al. // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2017. – Vol. 9, № 36. – P. 30502-30509.

61. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and

Limitations / D. Chang, M. Lim, J.A.C.M. Goos, et al. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1-20.

62. Boncel, S. Magnetic carbon nanostructures in medicine / S. Boncel, A.P. Herman, K.Z. Walczak // *Journal of Materials Chemistry*. – 2012. – Vol. 22, № 1. – P. 31-37.

63. Bovine Serum Albumin (BSA) coated iron oxide magnetic nanoparticles as biocompatible carriers for curcumin-anticancer drug / H. Nosrati, N. Sefidi, A. Sharafi, et al. // *Bioorganic Chemistry*. – 2018. – Vol. 76. – P. 501-509.

64. Brown, D. Developments in the processing and properties of NdFeB-type permanent magnets / D. Brown, B.M. Ma, Z. Chen // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2002. – Vol. 248, № 3. – P. 432-440.

65. Buyukhatipoglu, K. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation / K. Buyukhatipoglu, A.M. Clyne // *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. – 2011. – Vol. 96 A, № 1. – P. 186-195.

66. Byrne, J.D. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics / J.D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – Vol. 60, № 15. – P. 1615-1626.

67. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology / N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, et al. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2014. – Vol. 66. – P. 2-25.

68. Carbon nanomaterials combined with metal nanoparticles for theranostic applications / G. Modugno, C. Ménard-Moyon, M. Prato, A. Bianco // *British Journal of Pharmacology*. – 2015. – Vol. 172, № 4. – P. 975-991.

69. Carbon nanotubes: Applications in pharmacy and medicine / H. He, L.A. Pham-Huy, P. Dramou, et al. // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-12.

70. Carmeliet, P. Angiogenesis in cancer and other diseases / P. Carmeliet, R.K. Jain // *Nature*. – 2000. – Vol. 407, № 6801. – P. 249-257.

71. Catalytic inactivation of influenza virus by iron oxide nanozyme /



T. Qin, R. Ma, Y. Yin, et al. // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9, № 23. – P. 6920-6935.

72. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors / R.B. Campbell, D. Fukumura, E.B. Brown, et al. // *Cancer Research*. – 2002. – Vol. 62, № 23. – P. 6831-6836.

73. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors / T. Stylianopoulos, J.D. Martin, V.P. Chauhan, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, № 38. – P. 15101-15108.

74. Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery / U.O. Häfeli, J.S. Riffle, L. Harris-Shekhawat, et al. // *Molecular Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 6, № 5. – P. 1417-1428.

75. Cellular and molecular toxicity of iron oxide nanoparticles / B. Laffon, N. Fernández-Bertólez, C. Costa, et al. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2018. – Vol. 1048. – P. 199-213.

76. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells / A. Kumar, A.K. Pandey, S.S. Singh, et al. // *Chemosphere*. – 2011. – Vol. 83, № 8. – P. 1124-1132.

77. Characterization of cellular uptake and toxicity of aminosilane-coated iron oxide nanoparticles with different charges in central nervous system-relevant cell culture models / Z. Sun, V. Yathindranath, M. Worden, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 961-970.

78. Chertok, B. Circulating magnetic microbubbles for localized real-time control of drug delivery by ultrasonography-guided magnetic targeting and ultrasound / B. Chertok, R. Langer // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8, № 2. – P. 341-357.

79. Chitosan-stabilized iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging / I. Khmara, O. Strbak, V. Zavisova, et al. // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2019. – Vol. 474. – P. 319-325.

80. Chu, X. Surface modification of magnetic nanoparticles in biomedicine / X. Chu, J. Yu, Y.L. Hou // *Chinese Physics B*. – 2015. – Vol. 24, № 1. – P. 1-8.

81. Combined Magnetoliposome Formation and Drug Loading in One Step for Efficient Alternating Current-Magnetic Field Remote-Controlled Drug Release / M.E. Fortes Brollo, A. Domínguez-Bajo, A. Tabero, et al. // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2020. – Vol. 12, № 4. – P. 4295-4307.
82. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats / M.T. Zhu, W.Y. Feng, B. Wang, et al. // *Toxicology*. – 2008. – Vol. 247. – P. 102-111.
83. Comparison of cellular effects of starch-coated SPIONs and poly(Lactic-co-glycolic acid) matrix nanoparticles on human monocytes / D. Gonnissen, Y. Qu, K. Langer, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – P. 5221-5236.
84. Comparison of Reporter Gene and Iron Particle Labeling for Tracking Fate of Human Embryonic Stem Cells and Differentiated Endothelial Cells in Living Subjects / Z. Li, Y. Suzuki, M. Huang, et al. // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26, № 4. – P. 864-873.
85. Comparison of the targeting properties of 2-deoxy-D-glucose-conjugated nanoparticles to breast cancer MDA-MB-231 cells and breast fibroblasts / W. Peng, S. Xiu-hong, X. Fei, et al. // *Chinese Journal of Oncology*. – 2013. – Vol. 35, № 08. – P. 566-571.
86. Comparison of ultrasmall IONPs and Fe salts biocompatibility and activity in multi-cellular in vitro models / N. Janik-Olechawa, A. Drozd, D. Ryszawy, et al. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1-17.
87. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo / F. Chen, G. Wang, J.I. Griffin, et al. // *Nat Nanotechnol*. – 2017. – Vol. 12, № 4. – P. 387-393.
88. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress / S. Naqvi, M. Samim, M.Z. Abdin, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 983-989.
89. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis / J. Winkler, A. Abisoye-Ogunniyan, K.J. Metcalf, Z. Werb // *Nature*

Communications. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 1-19.

90. Contact activation of kallikrein-kinin system by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in vitro and in vivo / D. Simberg, W.M. Zhang, S. Merkulov, et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2009. – Vol. 140, № 3. – P. 301-305.

91. Cregg, P.J. Inclusion of magnetic dipole-dipole and hydrodynamic interactions in implant-assisted magnetic drug targeting / P.J. Cregg, K. Murphy, A. Mardinoglu // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2009. – Vol. 321, № 23. – P. 3893-3898.

92. Current and emerging therapies of HER2-positive metastatic breast cancer / A. Hernández-Blanchis, D. Touya, K. Strasser-Weippl, et al. // *Breast*. – 2016. – Vol. 29. – P. 170-177.

93. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts / J.M. Veranth, E.G. Kaser, M.M. Veranth, et al. // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2007. – Vol. 4. – P. 1-18.

94. Deatsch, A.E. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia / A.E. Deatsch, B.A. Evans // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2014. – Vol. 354. – P. 163-172.

95. Design and construction of multifunctional hyperbranched polymers coated magnetite nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. / A. Mashhadi Malekzadeh, A. Ramazani, S.J. Tabatabaei Rezaei, H. Niknejad // *Journal of colloid and interface science*. – 2017. – Vol. 490. – P. 64-73.

96. DeStefano, V. Applications of PLA in modern medicine / V. DeStefano, S. Khan, A. Tabada // *Engineered Regeneration*. – 2020. – Vol. 1. – P. 76-87.

97. Detection of HER2 through Antibody Immobilization Is Influenced by the Properties of the Magnetite Nanoparticle Coating / E. Villegas-Serralta, O. Zavala, I.A. Flores-Urquiza, et al. // *Journal of Nanomaterials*. – 2018. –

Vol. 2018. – P. 1-9.

98. Development and Characterization of Magnetite/Poly(butylcyanoacrylate) Nanoparticles for Magnetic Targeted Delivery of Cancer Drugs / M. López-Viota, M.M. El-Hammadi, L. Cabeza, et al. // *AAPS PharmSciTech.* – 2017. – Vol. 18, № 8. – P. 3042-3052.

99. Development of a lauric acid/albumin hybrid iron oxide nanoparticle system with improved biocompatibility / J. Zaloga, C. Janko, J. Nowak, et al. // *International Journal of Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9. – P. 4847-4866.

100. Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging / M.A. González-Gómez, S. Belderbos, S. Yañez-Vilar, et al. // *Nanomaterials.* – 2019. – Vol. 9, № 11. – P. 1-20.

101. Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture / M. Yu, S. Huang, K.J. Yu, A.M. Clyne // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2012. – Vol. 13, № 5. – P. 5554-5570.

102. Differential effects of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production / M. Rinaldi, F. Ceciliani, C. Lecchi, et al. // *Veterinary Immunology and Immunopathology.* – 2008. – Vol. 126, № 3-4. – P. 199-210.

103. Differential internalization of brick shaped iron oxide nanoparticles by endothelial cells / Z. Sun, M. Worden, Y. Wroczynskyj, et al. // *Journal of Materials Chemistry B.* – 2016. – Vol. 4, № 35. – P. 5913-5920.

104. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles / Z.J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, et al. // *Nanotechnology.* – 2009. – Vol. 20, № 45. doi: 10.1088/0957-4484/20/45/455101.

105. Don, H. Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications. / H. Don, S. Xiaolian, S. Shouheng // *Accounts of chemical research.* – 2011. – Vol. 44, № 10. – P. 875-82.

106. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress

/ T. Lammers, F. Kiessling, W.E. Hennink, G. Storm // *Journal of Controlled Release*. – 2012. – Vol. 161, № 2. – P. 175-187.

107. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture / G. Garçon, Z. Dagher, F. Zerimech, et al. // *Toxicology in Vitro*. – 2006. – Vol. 20, № 4. – P. 519-528.

108. Effect of surface modification on magnetization of iron oxide nanoparticle colloids / Y. Yuan, D. Rende, C.L. Altan, et al. // *Langmuir*. – 2012. – Vol. 28, № 36. – P. 13051-13059.

109. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response / G. Maiorano, S. Sabella, B. Sorce, et al. // *ACS Nano*. – 2010. – Vol. 4, № 12. – P. 7481-7491.

110. Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells / C. Strehl, T. Gaber, L. Maurizi, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 3429-3445.

111. Effects of surface modification on the properties of magnetic nanoparticles/PLA composite drug carriers and in vitro controlled release study / X. Zhang, L. Xue, J. Wang, et al. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2013. – Vol. 431. – P. 80-86.

112. Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells / A. Kunzmann, B. Andersson, C. Vogt, et al. // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2011. – Vol. 253, № 2. – P. 81-93.

113. Egeblad, M. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism / M. Egeblad, E.S. Nakasone, Z. Werb // *Developmental Cell*. – 2010. – Vol. 18, № 6. – P. 884-901.

114. EGFR-Targeted Hybrid Plasmonic Magnetic Nanoparticles Synergistically Induce Autophagy and Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells / T. Yokoyama, J. Tam, S. Kuroda, et al. // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, № 11. – P. 1-13.

115. EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a / M. Creixell, M. Torres-lugo, C. Rinaldi, A.C. Boh // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5, № 9. – P. 7124-7129.
116. Elliott, R.S. Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials / R.S. Elliott, F.K. Storm, D.L. Morton // Cancer Research. – 1979. – Vol. 39. – P. 2245-2251.
117. Endothelial cell response to (co)polymer nanoparticles depending on the inflammatory environment and comonomer ratio / C. Wischke, A. Krüger, T. Roch, et al. // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2013. – Vol. 84, № 2. – P. 288-296.
118. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation / S. Giannitsi, B. Maria, A. Bechlioulis, K. Naka // JRSM Cardiovascular Disease. – 2019. – Vol. 8. – P. 1-7.
119. Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: Risk factors for early atherosclerosis / M.T. Zhu, B. Wang, Y. Wang, et al. // Toxicology Letters. – 2011. – Vol. 203, № 2. – P. 162-171.
120. Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: Pathogenesis, assessment and implications / D. Cibor, R. Domagala-Rodacka, T. Rodacki, et al. // World Journal of Gastroenterology. – 2016. – Vol. 22, № 3. – P. 1067-1077.
121. Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: an evolving landscape (2017 Grover Conference Series) / B. Ranchoux, L.D. Harvey, R.J. Ayon, et al. // Pulmonary Circulation. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1-17.
122. Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications / A. Battigelli, C. Ménard-Moyon, T. Da Ros, et al. // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2013. – Vol. 65, № 15. – P. 1899-1920.
123. Enhancing the magnetic and inductive heating properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles via morphology control / J. Mohapatra, M. Xing, J. Beatty, et al. // Nanotechnology. – 2020. – Vol. 31 (27), № 27. – P. 1-23.
124. Eryptosis Indices as a Novel Predictive Parameter for Biocompatibility

of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles on Erythrocytes / Q. Ran, Y. Xiang, Y. Liu, et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 1-15.

125. Evaluation of DNA interaction, genotoxicity and oxidative stress induced by iron oxide nanoparticles both in vitro and in vivo: attenuation by thymoquinone / M.O. Ansari, N. Parveen, M.F. Ahmad, et al. // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1-14.

126. Exploring the use of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx®) as pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy / M. Robella, M. Vaira, M. Argenziano, et al. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1-6.

127. Extracellular biosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by *Bacillus cereus* strain HMH1: Characterization and in vitro cytotoxicity analysis on MCF-7 and 3T3 cell lines / M. Fatemi, N. Mollania, M. Momeni-Moghaddam, F. Sadeghifar // *Journal of Biotechnology*. – 2018. – Vol. 270. – P. 1-11.

128. Fabrication of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mSiO<sub>2</sub> Core-Shell Composite Nanoparticles for Drug Delivery Applications / S.I. Uribe Madrid, U. Pal, Y.S. Kang, et al. // *Nanoscale Research Letters*. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 1-8.

129. Fang, J. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect / J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2011. – Vol. 63, № 3. – P. 136-151.

130. Fatima, H. Fundamentals to Apply Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia Therapy / H. Fatima, T. Charinpanitkul, K.-S. Kim // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11, № 5. – P. 1-20.

131. Fept nanoparticles as a potential X-ray activated chemotherapy agent for hela cells / Y. Zheng, Y. Tang, Z. Bao, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 6435-6444.

132. Ferroferric oxide nanoparticles induce prosurvival autophagy in human blood cells by modulating the Beclin 1/Bcl-2/VPs34 complex / M. Shi, L. Cheng, Z. Zhang, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 207-216.

133. Ferumoxylol and Cpg oligodeoxynucleotide 2395 synergistically enhance antitumor activity of macrophages against NSCLC with EGFR1858r/t790m mutation / G. Wang, J. Zhao, M. Zhang, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 14. – P. 4503-4515.

134. Fischer, E.G. Nuclear Morphology and the Biology of Cancer Cells / E.G. Fischer // *Acta Cytologica*. – 2020. – Vol. 64, № 6. – P. 511-519.

135. Flexible filaments for in vivo imaging and delivery: Persistent circulation of filomicelles opens the dosage window for sustained tumor shrinkage / D.A. Christian, S. Cai, O.B. Garbuzenko, et al. // *Molecular Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 6, № 5. – P. 1343-1352.

136. Flores GA, L.J. In-vitro blockage of a simulated vascular system using magnetorheological fluids as a cancer therapy / L.J. Flores GA // *Eur Cell Mater*. – 2002. – Vol. 3. – P. 9-11.

137. Functionalized graphene oxide-based thermosensitive hydrogel for magnetic hyperthermia therapy on tumors / X. Zhu, H. Zhang, H. Huang, et al. // *Nanotechnology*. – 2015. – Vol. 26, № 36. – P. 1-13.

138. Gaharwar, U.S. Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes / U.S. Gaharwar, R. Meena, P. Rajamani // *Journal of Applied Toxicology*. – 2017. – Vol. 37, № 10. – P. 1232-1244.

139. Gao, L. Iron Oxide Nanozyme: A Multifunctional Enzyme Mimetic for Biomedical Applications / L. Gao, K. Fan, X. Yan // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7, № 13. – P. 3207-3227.

140. Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis, and Treatment / X. Lin, Z. Xiao, T. Chen, et al. // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1-10.

141. Grosse, S. Iron oxide nanoparticles modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in primary human monocytes / S. Grosse, J. Stenvik, A.M. Nilsen // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – P. 4625-4642.



142. Gupta, A.K. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications / A.K. Gupta, M. Gupta // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26, № 18. – P. 3995-4021.

143. Heidt, T. Multimodal iron oxide nanoparticles for hybrid biomedical imaging / T. Heidt, M. Nahrendorf // *NMR in biomedicine*. – 2013. – Vol. 26, № 7. – P. 756-765.

144. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood / S. Krajewski, R. Prucek, A. Panacek, et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9, № 7. – P. 7460-7468.

145. HIF-1 $\alpha$  promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment / M. Wang, X. Zhao, D. Zhu, et al. // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 36, № 1. – P. 1-14.

146. Hoppenz, P. Peptide-Drug Conjugates and Their Targets in Advanced Cancer Therapies / P. Hoppenz, S. Els-Heindl, A.G. Beck-Sickinger // *Frontiers in Chemistry*. – 2020. – Vol. 8. – P. 1-24.

147. Horsman, M.R. Hyperthermia: a Potent Enhancer of Radiotherapy / M.R. Horsman, J. Overgaard // *Clinical Oncology*. – 2007. – Vol. 19, № 6. – P. 418-426.

148. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02033447>. – URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02033447> (date accessed: 21.08.2021). – Text : electronic.

149. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells as cellular delivery vehicles for prodrug gene therapy of glioblastoma / X.Y. Bak, D.H. Lam, J. Yang, et al. // *Human Gene Therapy*. – 2011. – Vol. 22, № 11. – P. 1365-1377.

150. Hybrid gold-iron oxide nanoparticles as a multifunctional platform for biomedical application / C. Hoskins, Y. Min, M. Gueorguieva, et al. // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2012. – Vol. 10 (27), № 1. – P. 1-12.

151. Hyperbaric Oxygen Potentiates Doxil Antitumor Efficacy by Promoting Tumor Penetration and Sensitizing Cancer Cells / X. Wu, Y. Zhu, W. Huang, et al. // *Advanced Science*. – 2018. – Vol. 5, № 8. – P. 1-12.
152. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism / W. Zeng, P. Liu, W. Pan, et al. // *Cancer Letters*. – 2015. – Vol. 356, № 2. – P. 263-267.
153. Ilinskaya, A.N. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: Safety concerns / A.N. Ilinskaya, M.A. Dobrovolskaia // *Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8, № 6. – P. 969-981.
154. Imaging constructs: The rise of iron oxide nanoparticles / B.E.B. Crețu, G. Dodi, A. Shavandi, et al. // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 11. – P. 1-45.
155. Immunogenicity assays for antibody-drug conjugates: case study with ado-trastuzumab emtansine / M. Carrasco-Triguero, J.-H. Yi, R. Dere, et al. // *Bioanalysis*. – 2013. – Vol. 5, № 9. – P. 1007-1023.
156. Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles / M.M. Yallapu, N. Chauhan, S.F. Othman, et al. // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 46. – P. 1-12.
157. Improvement and extension of anti-EGFR targeting in breast cancer therapy by integration with the Avidin-Nucleic-Acid-Nano-Assemblies / F. Roncato, F. Rruga, E. Porcù, et al. // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 1-11.
158. In-vitro in-vivo correlation (IVIVC) in nanomedicine: Is protein corona the missing link? / P. Jain, R.S. Pawar, R.S. Pandey, et al. // *Biotechnology Advances*. – 2017. – Vol. 35, № 7. – P. 889-904.
159. In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation and Quantification of Iron Oxide Nanoparticles / U. Patil, S. Adireddy, A. Jaiswal, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16, № 10. – P. 24417-24450.
160. In Vitro and in Vivo Studies of FePt Nanoparticles for Dual Modal CT/MRI Molecular Imaging / S. Chou, Y. Shau, P. Wu, Y. Yang // *J. AM. CHEM. SOC.* – 2010. – Vol. 132, № 14. – P. 13270-13278.
161. In vitro assessments of nanomaterial toxicity / C.F. Jones,

D.W. Grainger, J. CF, G. DW // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2009. – Vol. 61, № 6. – P. 438-456.

162. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles / H. Arami, A. Khandhar, D. Liggitt, K.M. Krishnan // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44, № 23. – P. 8576-8607.

163. Influence of morphology and surface exchange reaction on magnetic properties of monodisperse magnetite nanoparticles / M. Song, Y. Zhang, S. Hu, et al. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2012. – Vol. 408. – P. 114-121.

164. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a “Trojan horse” / M.E. Wieder, D.C. Hone, M.J. Cook, et al. // *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. – 2006. – Vol. 5, № 8. – P. 727-734.

165. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme / K. Maier-Hauff, R. Rothe, R. Scholz, et al. // *Journal of Neuro-Oncology*. – 2007. – Vol. 81, № 1. – P. 53-60.

166. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles / L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, et al. // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – Vol. 2, № 9. – P. 577-583.

167. Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: Characterization and Toxicity Evaluation by In Vitro and In Vivo Assays / A.M. Prodan, S.L. Iconaru, C.S. Ciobanu, et al. // *Journal of Nanomaterials*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-10.

168. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications / S.M. Dadfar, K. Roemhild, N.I. Drude, et al. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2019. – Vol. 138. – P. 302-325.

169. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling / P.L. Apopa, Y. Qian, R. Shao, et al. // *Particle and Fibre Toxicology*.

– 2009. – Vol. 6. – P. 1-14.

170. Iron oxide nanoparticles induce reversible endothelial-to-mesenchymal transition in vascular endothelial cells at acutely non-cytotoxic concentrations / T. Wen, L. Du, B. Chen, et al. // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2019. – Vol. 16, № 1. – P. 1-13.

171. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues / S. Zanganeh, G. Hutter, R. Spitler, et al. // *Nature nanotechnology*. – 2016. – Vol. 11, № 11. – P. 986-994.

172. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation / Z. Yarjanli, K. Ghaedi, A. Esmaeili, et al. // *BMC Neuroscience*. – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 1-12.

173. Iron oxide nanoparticles modulate heat shock proteins and organ specific markers expression in mice male accessory organs / K. Sundarraj, A. Raghunath, L. Panneerselvam, E. Perumal // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2017. – Vol. 317. – P. 12-24.

174. Iron oxide nanoparticles promote vascular endothelial cells survival from oxidative stress by enhancement of autophagy / J. Duan, J. Du, R. Jin, et al. // *Regenerative Biomaterials*. – 2019. – Vol. 6, № 4. – P. 221-229.

175. Iron Oxide Nanoradiomaterials: Combining Nanoscale Properties with Radioisotopes for Enhanced Molecular Imaging / J. Pellico, J. Llop, I. Fernández-Barahona, et al. // *Contrast Media & Molecular Imaging*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-24.

176. Iron oxide nanozyme suppresses intracellular *Salmonella* Enteritidis growth and alleviates infection in vivo / S. Shi, S. Wu, Y. Shen, et al. // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8, № 22. – P. 6149-6162.

177. Islam, R. Factors affecting the dynamics and heterogeneity of the EPR effect: pathophysiological and pathoanatomic features, drug formulations and physicochemical factors / R. Islam, H. Maeda, J. Fang // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2021. – Vol. 11. – P. 1-14.

178. Katalin Farkas, C.J. Hemocompatibility and Biomedical Potential of

Poly(Gallic Acid) Coated Iron Oxide Nanoparticles for Theranostic Use / C.J. Katalin Farkas // *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. – 2015. – Vol. 5 (6), № 6. – P. 1-7.

179. Kempe, H. Nanomedicine's promising therapy: Magnetic drug targeting / H. Kempe, S.A. Kates, M. Kempe // *Expert Review of Medical Devices*. – 2011. – Vol. 8, № 3. – P. 291-294.

180. Kobayashi, H. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target? / H. Kobayashi, R. Watanabe, P.L. Choyke // *Theranostics*. – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 81-89.

181. Komarova, Y. Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways / Y. Komarova, A.B. Malik // *Annual Review of Physiology*. – 2010. – Vol. 72, № 1. – P. 463-493.

182. Kong, J. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures / J. Kong, S. Yu // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. – 2007. – Vol. 39, № 8. – P. 549-559.

183. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles / F. Kratz // *Journal of Controlled Release*. – 2008. – Vol. 132, № 3. – P. 171-183.

184. Laurent, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer / S. Laurent, M. Mahmoudi // *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 367.

185. Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications / C. Martinez-Boubeta, K. Simeonidis, A. Makridis, et al. // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 3. – P. 1-8.

186. Ledermann, J.A. Targeting the folate receptor: Diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments / J.A. Ledermann, S. Canevari, T. Thigpen // *Annals of Oncology*. – 2015. – Vol. 26, № 10. – P. 2034-2043.

187. Li, Y.M. Targeted toxins in brain tumor therapy / Y.M. Li, W.A. Hall // *Toxins*. – 2010. – Vol. 2, № 11. – P. 2645-2662.

188. Lieleg, O. Selective filtering of particles by the extracellular matrix: An electrostatic bandpass / O. Lieleg, R.M. Baumgärtel, A.R. Bausch // *Biophysical Journal*. – 2009. – Vol. 97, № 6. – P. 1569-1577.
189. Liou, G.Y. Reactive oxygen species in cancer. Vol. 44 / G.Y. Liou, P. Storz. – 2010. – 479-496 p.
190. Low toxicity and long circulation time of Polyampholyte-coated magnetic nanoparticles for blood pool contrast agents / Q. Wang, M. Shen, T. Zhao, et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 1-8.
191. Lugano, R. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities / R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2020. – Vol. 77, № 9. – P. 1745-1770.
192. Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging / C. Corot, K.G. Petry, R. Trivedi, et al. // *Investigative Radiology*. – 2004. – Vol. 39, № 10. – P. 619-625.
193. Magnetic field-assisted selective delivery of doxorubicin to cancer cells using magnetoliposomes as drug nanocarriers / A. Szuplewska, A.R. Joniec, E. Pocztańska, et al. // *Nanotechnology*. – 2019. – Vol. 30, № 31. – P. 1-31.
194. Magnetic hyperthermia with magnetite nanoparticles: electrostatic and polymeric stabilization / G. Iglesias, A. V. Delgado, M. Kujda, M.M. Ramos-Tejada // *Colloid and Polymer Science*. – 2016. – Vol. 294, № 10. – P. 1541-1550.
195. Magnetic liposomes for colorectal cancer cells therapy by high-frequency magnetic field treatment / A. Hardiansyah, L.Y. Huang, M.C. Yang, et al. // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 1-13.
196. Magnetic nanoparticle-loaded polymer nanospheres as magnetic hyperthermia agents / X.L. Liu, E.S.G. Choo, A.S. Ahmed, et al. // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 120-128.
197. Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications / J. Kudr, Y. Haddad, L. Richtera, et al. // *Nanomaterials*. – 2017. – Vol. 7 (243), № 243. – P. 1-29.

198. Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine / K. Niemirowicz, K.H. Markiewicz, A.Z. Wilczewska, H. Car // *Advances in Medical Sciences*. – 2012. – Vol. 57, № 2. – P. 196-207.

199. Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy / L. Zhu, Z. Zhou, H. Mao, L. Yang // *Nanomedicine (London, England)*. – 2017. – Vol. 12, № 1. – P. 73-87.

200. Magnetic particle hyperthermia - Properties of magnetic multicore nanoparticles administered to tumor tissue / S. Dutz, M. Kettering, I. Hilger, et al. – 2012. – 76 p.

201. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics / M. V. Efremova, V.A. Naumenko, M. Spasova, et al. // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1-19.

202. Magneto acoustic tomography with short pulsed magnetic field for in-vivo imaging of magnetic iron oxide nanoparticles / L. Mariappan, Q. Shao, C. Jiang, et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2016. – Vol. 12, № 3. – P. 689-699.

203. Magnetoliposomes in Controlled-Release Drug Delivery Systems / A. Tomitaka, Y. Takemura, Z. Huang, et al. // *Critical reviews in biomedical engineering*. – 2019. – Vol. 47, № 6. – P. 495-505.

204. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / J.B.A.G. Haanen, F. Carbonnel, C. Robert, et al. // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28, № Supplement 4. – P. 119-142.

205. Mandal, S. Magnetic core-shell nanoparticles for biomedical applications / S. Mandal, K. Chaudhuri // *Complex Magnetic Nanostructures*. Cham: Springer International Publishing. – 2017. – Vol. 5. – P. 425-453.

206. Manke, A. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity / A. Manke, L. Wang, Y. Rojanasakul // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-15.

207. Martens, C.R. The Vascular Endothelium in Chronic Kidney Disease: A Novel Target for Aerobic Exercise / C.R. Martens, D.L. Kirkman, D.G. Edwards // *Exercise and Sport Sciences Reviews*. – 2016. – Vol. 44, № 1. – P. 12-19.

208. Matsumura, Y. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer Research*. – 1986. – Vol. 46, № 8. – P. 6387-6392.

209. Meacham, C.E. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity / C.E. Meacham, S.J. Morrison // *Nature*. – 2013. – Vol. 501, № 7467. – P. 328-337.

210. Mehta, R. V. Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology / R.V. Mehta // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. – Vol. 79, № 2016. – P. 901-916.

211. Microfluidic self-assembly of a combinatorial library of single- and dual-ligand liposomes for in vitro and in vivo tumor targeting / R. Ran, H. Wang, Y. Liu, et al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2018. – Vol. 130. – P. 1-10.

212. Microgel coating of magnetic nanoparticles via bienzyme-mediated free-radical polymerization for colorimetric detection of glucose / Q. Wu, X. Wang, C. Liao, et al. // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7, № 40. – P. 16578-16582.

213. Mitigation of eddy current heating during magnetic nanoparticle hyperthermia therapy / R. V. Stigliano, F. Shubitidze, J.D. Petryk, et al. // *International Journal of Hyperthermia*. – 2016. – Vol. 32, № 7. – P. 735-748.

214. Mitigation of magnetic particle hyperthermia side effects by magnetic field controls / A.-R. Tsiapla, A.-A. Kalimeri, N. Maniotis, et al. // *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. – 2021. – Vol. 38, № 1. – P. 511-522.

215. Mitochondrial electron transport chain identified as a novel molecular target of SPIO nanoparticles mediated cancer-specific cytotoxicity / C. He, S. Jiang,



H. Jin, et al. // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 83. – P. 102-114.

216. Moloney, J.N. ROS signalling in the biology of cancer / J.N. Moloney, T.G. Cotter // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2018. – Vol. 80. – P. 50-64.

217. Monodisperse Au-Fe<sub>2</sub>C Janus Nanoparticles: An Attractive Multifunctional Material for Triple-Modal Imaging-Guided Tumor Photothermal Therapy / Y. Ju, H. Zhang, J. Yu, et al. // *ACS nano*. – 2017. – Vol. 11, № 9. – P. 9239-9248.

218. Monodispersed core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles / L. Wang, J. Luo, Q. Fan, et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – Vol. 109, № 46. – P. 21593-21601.

219. Morphophysiological changes in wheat (*Triticum vulgare* L.) under the influence of metal nanoparticles (Fe, Ni, Ni) and their oxides (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CuO, NiO) / A.M. Korotkova, S.V. Lebedev, F.G. Kajumov, E.A. Sizova // *Agricultural Biology*. – 2017. – Vol. 52 (1). – P. 172-182.

220. Mourdikoudis, S. Magnetic Nanoparticle Composites: Synergistic Effects and Applications / S. Mourdikoudis, A. Kostopoulou, A.P. LaGrow // *Advanced Science*. – 2021. – Vol. 2004951. – P. 1-57.

221. Movia, D. Multilayered nanoparticles for personalized medicine: translation into clinical markets / D. Movia, C. Poland // *Clin. Nanomedicine Nanoparticles*. – 2016. – Vol. 53. – P. 299–318.

222. MRI of High-Glucose Metabolism Tumors: a Study in Cells and Mice with 2-DG-Modified Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles / X.F. Shan, X.H. Wang, P.N. Gu, et al. // *Molecular Imaging and Biology*. – 2016. – Vol. 18, № 1. – P. 24-33.

223. Muhamad, N. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: A systematic review / N. Muhamad, T. Plengsuriyakarn, K. Na-Bangchang // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – Vol. 13. – P. 3921-3935.

224. Multifunctional Chitosan Magnetic-Graphene (CMG) Nanoparticles: a

Theranostic Platform for Tumor-targeted Co-delivery of Drugs, Genes and MRI Contrast Agents / C. Wang, S. Ravi, U.S. Garapati, et al. // *Journal of materials chemistry. B.* – 2013. – Vol. 1, № 35. – P. 4396-4405.

225. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: An advanced platform for cancer theranostics / S. Zhao, X. Yu, Y. Qian, et al. // *Theranostics.* – 2020. – Vol. 10, № 14. – P. 6278-6309.

226. Muthiah, M. Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting / M. Muthiah, I.K. Park, C.S. Cho // *Biotechnology Advances.* – 2013. – Vol. 31, № 8. – P. 1224-1236.

227. Nanoparticle-Based Drug Delivery System: A Patient-Friendly Chemotherapy for Oncology / L. Yan, J. Shen, J. Wang, et al. // *Dose-Response.* – 2020. – Vol. 18, № 3. – P. 1-12.

228. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem / H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari // *Nano Today.* – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 487-510.

229. Nanoparticles and endothelium: An update on the toxicological interactions / A.B. Engin, M. Neagu, K. Golokhvast, A. Tsatsakis // *Farmacia.* – 2015. – Vol. 63, № 6. – P. 792-804.

230. Nanoparticles functionalized with Pep-1 as potential glioma targeting delivery system via interleukin 13 receptor  $\alpha 2$ -mediated endocytosis / B. Wang, L. Lv, Z. Wang, et al. // *Biomaterials.* – 2014. – Vol. 35, № 22. – P. 5897-5907.

231. Nanoscale artificial antigen presenting cells for T cell immunotherapy / K. Perica, A. De León Medero, M. Durai, et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 119-129.

232. Nanoscale Therapeutic System: Safety Assessment Features / E.M. Bovina, B.K. Romanov, A.S. Kazakov, et al. // *Safety and Risk of Pharmacotherapy.* – 2019. – Vol. 7, № 3. – P. 127-138.

233. Nanoscintillator-Mediated X-ray Inducible Photodynamic Therapy for in Vivo Cancer Treatment / H. Chen, G.D. Wang, Y.J. Chuang, et al. // *Nano Letters.* – 2015. – Vol. 15, № 4. – P. 2249-2256.

234. Nanotechnology-enabled materials for hemostatic and anti-infection treatments in orthopedic surgery / H. Sun, L. Lv, Y. Bai, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – Vol. 13. – P. 8325-8338.

235. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons / T.R. Pisanic, J.D. Blackwell, V.I. Shubayev, et al. // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28, № 16. – P. 2572-2581.

236. Natarajan, P. Understanding the influence of experimental factors on bio-interactions of nanoparticles: Towards improving correlation between in vitro and in vivo studies / P. Natarajan, J.M. Tomich // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2020. – Vol. 694. – P. 1-18.

237. Near-infrared light-triggered, targeted drug delivery to cancer cells by aptamer gated nanovehicles / X. Yang, X. Liu, Z. Liu, et al. // *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*. – 2012. – Vol. 24, № 21. – P. 2890-2895.

238. Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia / C.L. Dennis, A.J. Jackson, J.A. Borchers, et al. // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20, № 39. – P. 1-15.

239. New sight at the organization of layers of multilayer polyelectrolyte microcapsules / E. V. Musin, A.L. Kim, A. V. Dubrovskii, S.A. Tikhonenko // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1-7.

240. Nguyen, D.H. Biodegradable gelatin decorated fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub> nanoparticles for paclitaxel delivery / D.H. Nguyen // *Vietnam Journal of Science and Technology*. – 2018. – Vol. 55, № 1B. – P. 1-12.

241. Nicotine hydrogen tartrate loaded chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and in vitro delivery from dry powder inhaler formulation / H. Wang, G. George, S. Bartlett, et al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2017. – Vol. 113. – P. 118-131.

242. Nieto, C. Trastuzumab: More than a guide in her2-positive cancer nanomedicine / C. Nieto, M.A. Vega, E.M.M. Del Valle // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10, № 9. – P. 1-20.

243. Novel biocompatible and biodegradable PCL-PLA/ iron oxide NPs

marker clip composite for breast cancer biopsy / A.R. Hernandez-Martinez, G.A. Molina, R. Esparza, et al. // *Polymers*. – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 1-17.

244. Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles / A.K. Johnson, A.M. Zawadzka, L.A. Deobald, et al. // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2008. – Vol. 10, № 6. – P. 1009-1025.

245. Oberdörster, G. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles / G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster // *Environmental Health Perspectives*. – 2005. – Vol. 113, № 7. – P. 823-839.

246. Observation and modelling of capillary flow occlusion resulting from the capture of superparamagnetic nanoparticles in a magnetic field / B. Hallmark, N.J. Darton, X. Han, et al. // *Chemical Engineering Science*. – 2008. – Vol. 63, № 15. – P. 3960-3965.

247. Optimization of surface coating on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for high performance magnetic hyperthermia agents / X.L. Liu, H.M. Fan, J.B. Yi, et al. // *Journal of Materials Chemistry*. – 2012. – Vol. 22, № 17. – P. 8235-8244.

248. Organ-specific toxicity of magnetic iron oxide-based nanoparticles / V. V. Chrishtop, V.A. Mironov, A.Y. Prilepskii, et al. // *Nanotoxicology*. – 2021. – Vol. 15, № 2. – P. 167-204.

249. Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures / K. Murugan, Y.E. Choonara, P. Kumar, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 2191-2206.

250. PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles / J. Xie, K. Chen, J. Huang, et al. // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31, № 11. – P. 3016-3022.

251. PH-Responsive, Self-Sacrificial Nanotheranostic Agent for Potential in Vivo and in Vitro Dual Modal MRI/CT Imaging, Real-Time, and in Situ Monitoring of Cancer Therapy / Y. L, W. J, D. Z, et al. // *Bioconjugate Chemistry*. – 2017. – Vol. 28, № 2. – P. 400-409.

252. PH-responsive nanoparticles for cancer drug delivery / Y. Shen, H. Tang, M. Radosz, et al. // *Methods in Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 437. – P. 183-216.

253. Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors / T. Ojha, V. Pathak, Y. Shi, et al. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2017. – Vol. 119. – P. 44-60.

254. Physiological aspects in magnetic drug-targeting / A.S. Lübbe, C. Bergemann, J. Brock, D.G. McClure // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 1999. – Vol. 194, № 1. – P. 149-155.

255. Podrepšek, G.H. Development of chitosan functionalized magnetic nanoparticles with bioactive compounds / G.H. Podrepšek, Ž. Knez, M. Leitgeb // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10, № 10. – P. 1-25.

256. Polymer-Magnetic Composite Fibers for Remote-Controlled Drug Release / A.S. Perera, S. Zhang, S. Homer-Vanniasinkam, et al. // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2018. – Vol. 10, № 18. – P. 15524-15531.

257. Positron Emission Tomography Based Elucidation of the Enhanced Permeability and Retention Effect in Dogs with Cancer Using Copper-64 Liposomes / A.E. Hansen, A.L. Petersen, J.R. Henriksen, et al. // *ACS Nano*. – 2015. – Vol. 9, № 7. – P. 6985-6995.

258. Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles / F.K.H. van Landeghem, K. Maier-Hauff, A. Jordan, et al. // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 52-57.

259. Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: A review / N. Malhotra, J.S. Lee, R.A.D. Liman, et al. // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 14. – P. 1-26.

260. Precise synthesis of discrete and dispersible carbon-protected magnetic nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging and photothermal therapy / A.H. Lu, X.Q. Zhang, Q. Sun, et al. // *Nano Research*. – 2016. – Vol. 9, № 5. – P. 1460-1469.

261. Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system / Q. Peng, S. Zhang, Q. Yang, et al. // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34, № 33. – P. 8521-8530.

262. Preparation, characterization and targeting of micronized 10-

hydroxycamptothecin-loaded folate-conjugated human serum albumin nanoparticles to cancer cells. / Q. Li, C. Liu, X. Zhao, et al. // International journal of nanomedicine. – 2011. – Vol. 6. – P. 397-405.

263. Preparation and biomedical applications of core-shell silica/magnetic nanoparticle composites / C. Li, C. Ma, F. Wang, et al. // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 2964-2972.

264. Preparation and biomedical applications of gold-coated magnetic nanocomposites / H. Jiang, X. Zeng, N. He, et al. // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 1617-1625.

265. Preparation and characterization of superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CNTs nanocomposites dual-drug carrier / X. Zhang, L. Hao, H. Wang, et al. // Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition. – 2017. – Vol. 32, № 1. – P. 42-46.

266. Preparation of liposomes / S. Patil, S. Gattani, R. Gaud, et al. // Pharma Rev. – 2005. – Vol. 18. – P. 53-8.

267. Prevention of local tumor recurrence following surgery using low-dose chemotherapeutic polymer films / R. Liu, J.B. Wolinsky, J. Walpole, et al. // Annals of Surgical Oncology. – 2010. – Vol. 17, № 4. – P. 1203-1213.

268. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics / D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, et al. // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 1-12.

269. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes / A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely, et al. // Cancer Res. – 1994. – Vol. 54(4). – P. 987-92.

270. Proposed computed tomography contrast agent using carboxybetaine zwitterionic tantalum oxide nanoparticles imaging, biological, and physicochemical performance / P.F. Fitzgerald, M.D. Butts, J.C. Roberts, et al. // Investigative Radiology. – 2016. – Vol. 51, № 12. – P. 786-796.

271. Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the

Cellular Uptake / S. Ritz, S. Schöttler, N. Kotman, et al. // *Biomacromolecules*. – 2015. – Vol. 16, № 4. – P. 1311-1321.

272. Quintanilla-Carvajal, M.X. Role of Surfactants and Their Applications in Structured Nanosized Systems / M.X. Quintanilla-Carvajal, S. Matiacevich // *Food Engineering Series*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 177-186.

273. Rajan, A. Assessing magnetic and inductive thermal properties of various surfactants functionalised Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for hyperthermia / A. Rajan, M. Sharma, N.K. Sahu // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1-15.

274. Recent Advances in Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery / N. Amreddy, A. Babu, R. Muralidharan, et al. // *Advances in Cancer Research*. – 2018. – Vol. 137. – P. 115-170.

275. Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment / M.A. Subhan, S.S.K. Yalamarty, N. Filipczak, et al. // *Journal of Personalized Medicine*. – 2021. – Vol. 11, № 6. – P. 1-27.

276. Recent developments in the synthesis, properties, and biomedical applications of core/shell superparamagnetic iron oxide nanoparticles with gold / S. Sabale, P. Kandesar, V. Jadhav, et al. // *Biomaterials Science*. – 2017. – Vol. 5, № 11. – P. 2212-2225.

277. Reddy, U.A. Biomarkers of oxidative stress for in vivo assessment of toxicological effects of iron oxide nanoparticles / U.A. Reddy, P. V. Prabhakar, M. Mahboob // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2017. – Vol. 24, № 6. – P. 1172-1180.

278. Redox-responsive magnetic nanoparticle for targeted convection-enhanced delivery of O 6-benzylguanine to brain tumors / Z.R. Stephen, F.M. Kievit, O. Veiseh, et al. // *ACS Nano*. – 2014. – Vol. 8, № 10. – P. 10383-10395.

279. Reimer, P. Ferucarbotran (Resovist): A new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: Properties, clinical development, and applications / P. Reimer, T. Balzer // *European Radiology*. – 2003. – Vol. 13, № 6. – P. 1266-1276.

280. Roizin-Towle, L. The response of human and rodent cells to

hyperthermia / L. Roizin-Towle, J.P. Pirro // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.* – 1991. – Vol. 20, № 4. – P. 751-756.

281. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors / P.A. Netti, D.A. Berk, M.A. Swartz, et al. // *Cancer Research.* – 2000. – Vol. 60, № 9. – P. 2497-2503.

282. ROS-responsive chitosan coated magnetic iron oxide nanoparticles as potential vehicles for targeted drug delivery in cancer therapy / S. Ayyanaar, C. Balachandran, R.C. Bhaskar, et al. // *International Journal of Nanomedicine.* – 2020. – Vol. 15. – P. 3333-3346.

283. Saptarshi, S.R. Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle / S.R. Saptarshi, A. Duschl, A.L. Lopata // *Journal of Nanobiotechnology.* – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 1-12.

284. Scaling laws at the nanosize: the effect of particle size and shape on the magnetism and relaxivity of iron oxide nanoparticle contrast agents / E.D. Smolensky, H.-Y.E. Park, Y. Zhou, et al. // *Journal of Materials Chemistry B.* – 2013. – Vol. 1, № 22. – P. 2818-2828.

285. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes / R.K. Gilchrist, W.D. Shorey, R.C. Hanselman, et al. // *Ann. Surg.* – 1957. – Vol. 146. – P. 596-606.

286. Setyawati, M.I. The gap between endothelial cells: Key to the quick escape of nanomaterials? / M.I. Setyawati, C.Y. Tay, D.T. Leong // *Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9, № 11. – P. 1591-1594.

287. Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics / W. Xie, Z. Guo, F. Gao, et al. // *Theranostics.* – 2018. – Vol. 8, № 12. – P. 3284-3307.

288. Shape matters: Intravital microscopy reveals surprising geometrical dependence for nanoparticles in tumor models of extravasation / B.R. Smith, P. Kempen, D. Bouley, et al. // *Nano Letters.* – 2012. – Vol. 12, № 7. – P. 3369-3377.

289. Shaterabadi, Z. High impact of in situ dextran coating on biocompatibility, stability and magnetic properties of iron oxide nanoparticles /



Z. Shaterabadi, G. Nabiyouni, M. Soleymani // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. – Vol. 75. – P. 947-956.

290. Sheddable ternary nanoparticles for tumor acidity-targeted siRNA delivery / X.Z. Yang, J.Z. Du, S. Dou, et al. // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 771-781.

291. Shi, Y. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes / Y. Shi, P.M. Vanhoutte // *Journal of Diabetes*. – 2017. – Vol. 9, № 5. – P. 434-449.

292. Shimizu, M. Isoflavone intake inhibits the development of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) induced mammary tumors in normal andovariectomized rats / M. Shimizu, T. Yoshitomi, Y. Nagasaki // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2014. – Vol. 54, № 1. – P. 31-38.

293. Shimizu, M. The behavior of ROS-scavenging nanoparticles in blood / M. Shimizu, T. Yoshitomi, Y. Nagasaki // *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. – 2014. – Vol. 54, № 3. – P. 166-173.

294. Siemann, D.W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents / D.W. Siemann // *Cancer Treatment Reviews*. – 2011. – Vol. 37, № 1. – P. 63-74.

295. Significantly increased low shear rate viscosity, blood elastic modulus, and RBC aggregation in adults following cardiac surgery / Y.F. Wu, P.S. Hsu, C.S. Tsai, et al. // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1-10.

296. Simultaneous in vivo PET/MRI using fluorine-18 labeled Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Al(OH)<sub>3</sub> nanoparticles: comparison of nanoparticle and nanoparticle-labeled stem cell distribution / S. Belderbos, M.A. González-Gómez, F. Cleeren, et al. // *EJNMMI research*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1-13.

297. Size-dependent accumulation of pegylated silane-coated magnetic iron oxide nanoparticles in murine tumors / E.K.U. Larsen, T. Nielsen, T. Wittenborn, et al. // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 3, № 7. – P. 1947-1951.

298. Size-dependent effects of nanoparticles on enzymes in the blood coagulation cascade / E. Sanfins, C. Augustsson, B. Dahlbäck, et al. // *Nano Letters*.

– 2014. – Vol. 14, № 8. – P. 4736-4744.

299. Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting / H. Kang, S. Rho, W.R. Stiles, et al. // *Advanced Healthcare Materials*. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 8-15.

300. Size-Dependent Heating of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles / S. Tong, C.A. Quinto, L. Zhang, et al. // *ACS Nano*. – 2017. – Vol. 11, № 7. – P. 6808-6816.

301. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice / Y. L, K. H, Z. W, et al. // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7, № 2. – P. 625-636.

302. Size dependent kinetics of gold nanorods in EPR mediated tumor delivery / X. Tong, Z. Wang, X. Sun, et al. // *Theranostics*. – 2016. – Vol. 6, № 12. – P. 2039-2051.

303. Su, Q. Magnetic beads based rolling circle amplification-electrochemiluminescence assay for highly sensitive detection of point mutation / Q. Su, D. Xing, X. Zhou // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – Vol. 25, № 7. – P. 1615-1621.

304. Sun, B. Multifunctional poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer / B. Sun, B. Ranganathan, S.S. Feng // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 475-486.

305. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles impair endothelial integrity and inhibit nitric oxide production / K. Astanina, Y. Simon, C. Cavelius, et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10, № 11. – P. 4896-4911.

306. Surface functionalization-specific binding of coagulation factors by zinc oxide nanoparticles delays coagulation time and reduces thrombin generation potential in vitro / J.Y. Yang, J. Bae, A. Jung, et al. // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 7. – P. 1-15.

307. Surface modification of magnetite nanoparticles for biomedical applications / C. Barrera, A. Herrera, Y. Zayas, C. Rinaldi // *Journal of Magnetism*

and Magnetic Materials. – 2009. – Vol. 321, № 10. – P. 1397-1399.

308. Surface plasmon resonance enhanced magneto-optics (SuPREMO): Faraday rotation enhancement in gold-coated iron oxide nanocrystals / P.K. Jain, Y. Xiao, R. Walsworth, A.E. Cohen // Nano Letters. – 2009. – Vol. 9, № 4. – P. 1644-1650.

309. Synergetic effect of Ni<sup>2+</sup> and 5-acrylamidobenzoboroxole functional groups anchoring on magnetic nanoparticles for enhanced immobilization of horseradish peroxidase / J. Han, Y. Cai, Y. Wang, et al. // Enzyme and Microbial Technology. – 2019. – Vol. 120. – P. 136-143.

310. Synergistic antibacterial effects of localized heat and oxidative stress caused by hydroxyl radicals mediated by graphene/iron oxide-based nanocomposites / W.-Y. Pan, C.-C. Huang, T.-T. Lin, et al. // Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine. – 2016. – Vol. 12, № 2. – P. 431-438.

311. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles / A. Ali, H. Zafar, M. Zia, et al. // Nanotechnology, Science and Applications. – 2016. – Vol. 9. – P. 49-67.

312. Synthesis and application of magnetite dextran-spermine nanoparticles in breast cancer hyperthermia / R. Avazzadeh, E. Vasheghani-Farahani, M. Soleimani, et al. // Progress in Biomaterials. – 2017. – Vol. 6, № 3. – P. 75-84.

313. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications / G. Unsoy, S. Yalcin, R. Khodadust, et al. // Journal of Nanoparticle Research. – 2012. – Vol. 14, № 11. – P. 1-13.

314. Systematic surface engineering of magnetic nanoworms for in vivo tumor targeting / J.H. Park, G. Von Maltzahn, L. Zhang, et al. // Small. – 2009. – Vol. 5, № 6. – P. 694-700.

315. Targeted delivery of anticancer drugs with intravenously administered magnetic liposomes in osteosarcoma-bearing hamsters. / T. Kubo, T. Sugita, S. Shimose, et al. // International journal of oncology. – 2000. – Vol. 17, № 2. – P. 309-315.

316. Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin / X.M. Li, L.Y. Ding, Y. Xu, et al. // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 373. – P. 116-123.

317. Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications / B.B. Yellen, Z.G. Forbes, D.S. Halverson, et al. // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2005. – Vol. 293, № 1. – P. 647-654.

318. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies / K. Ulbrich, K. Holá, V. Šubr, et al. // *Chemical reviews*. – 2016. – Vol. 116, № 9. – P. 5338-5431.

319. Targeted magnetic nanoparticle hyperthermia for the treatment of oral cancer / C.J. Legge, H.E. Colley, M.A. Lawson, A.E. Rawlings // *Journal of Oral Pathology and Medicine*. – 2019. – Vol. 48, № 9. – P. 803-809.

320. Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy / S. Goodwin, C. Peterson, C. Hoh, C. Bittner // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 1999. – Vol. 194, № 1. – P. 132-139.

321. Targeting Glut1-overexpressing MDA-MB-231 cells with 2-deoxy-d-glucose modified SPIOs / X.H. Shan, H. Hu, F. Xiong, et al. // *European Journal of Radiology*. – 2012. – Vol. 81, № 1. – P. 95-99.

322. Tarkistani, M.A.M. Recent Advances in the Use of Iron–Gold Hybrid Nanoparticles for Biomedical Applications / M.A.M. Tarkistani, V. Komalla, V. Kayser // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11, № 5. – P. 1-23.

323. The cellular and molecular basis of hyperthermia / B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, et al. // *Critical reviews in oncology/hematology*. – 2002. – Vol. 43, № 1. – P. 33-56.

324. The cytotoxicity evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles on human aortic endothelial cells / G. Ge, H. Wu, F. Xiong, et al. // *Nanoscale Research Letters*. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 1-10.

325. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular

interaction / N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao // *Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11, № 6. – P. 673-692.

326. The effect of size and surface ligands of iron oxide nanoparticles on blood compatibility / T. Liu, R. Bai, H. Zhou, et al. // *RSC Advances*. – 2020. – Vol. 10, № 13. – P. 7559-7569.

327. The entry of nanoparticles into solid tumours / S. Sindhvani, A.M. Syed, J. Ngai, et al. // *Nature Materials*. – 2020. – Vol. 19, № 5. – P. 566-575.

328. The role of anisotropy in distinguishing domination of Néel or Brownian relaxation contribution to magnetic inductive heating: Orientations for biomedical applications / L.H. Nguyen, P.T. Phong, P.H. Nam, et al. // *Materials*. – 2021. – Vol. 14, № 8. – P. 11-13.

329. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox / D. Moris, M. Spartalis, E. Spartalis, et al. // *Annals of Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 5, № 16. – P. 1-11.

330. The Study of Aggregation Processes in Colloidal Solutions of Magnetite–Silica Nanoparticles by NMR Relaxometry, AFM, and UV–Vis Spectroscopy / Y. V. Bogachev, J.S. Chernenco, K.G. Gareev, et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2014. – Vol. 4, № 45. – P. 329-337.

331. Thermo-responsive magnetic liposomes for hyperthermia-triggered local drug delivery / M. Dai, C. Wu, H.M. Fang, et al. // *Journal of Microencapsulation*. – 2017. – Vol. 34, № 4. – P. 408-415.

332. Tian, X. Understanding the Nano–Bio Interactions and the Corresponding Biological Responses / X. Tian, Y. Chong, C. Ge // *Frontiers in Chemistry*. – 2020. – Vol. 8. – P. 1-5.

333. Timin, A.S. Multi-layer microcapsules: fresh insights and new applications / A.S. Timin, D.J. Gould, G.B. Sukhorukov // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2017. – Vol. 14, № 5. – P. 583-587.

334. Torres-Lugo, M. Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles / M. Torres-Lugo, C. Rinaldi // *Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8, № 10.

– P. 1689-1707.

335. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells / X. Wu, Y. Tan, H. Mao, M. Zhang // *International Journal of Nanomedicine*. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 385-399.

336. Toxicity assessment of silica coated iron oxide nanoparticles and biocompatibility improvement by surface engineering / M.A. Malvindi, V. De Matteis, A. Galeone, et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 1-11.

337. Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues / R. Vakili-Ghartavol, A.A. Momtazi-Borojeni, Z. Vakili-Ghartavol, et al. // *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 48, № 1. – P. 443-451.

338. Tracheobronchial tree: Expandable metallic stents used in experimental and clinical applications. Work in progress / M.J. Wallace, C. Charnsangavej, K. Ogawa, et al. // *Radiology*. – 1986. – Vol. 158, № 2. – P. 309-312.

339. Transferrin-modified liposomes triggered with ultrasound to treat HeLa cells / N.M. AlSawaftah, N.S. Awad, V. Paul, et al. // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1-15.

340. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low / W.G. Kreyling, M. Semmler, F. Erbe, et al. // *Journal of toxicology and environmental health. Part A*. – 2002. – Vol. 65, № 20. – P. 1513-1530.

341. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin / K.J. Widder, R.M. Morris, G. Poore, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1981. – Vol. 78, № 1 II. – P. 579-581.

342. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug / M.A. Miller, Y.R. Zheng, S. Gadde, et al. // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1-13.

343. Two types of magnetite-containing liposomes for magnetocontrolled drug release / M.N. Zharkov, M. V. Gerasimov, D.B. Trushina, et al. // *Journal of*

Physics: Conference Series. – 2019. – Vol. 1389, № 1. – P. 1-7.

344. Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in patients with acute myocardial infarction early clinical experience / S.R. Alam, A.S.V. Shah, J. Richards, et al. // *Circulation: Cardiovascular Imaging*. – 2012. – Vol. 5, № 5. – P. 559-565.

345. Update application of metallic stents in treatment of esophageal carcinoma / H.-S.S. Yang, L.-B.B. Zhang, T.-W.W. Wang, et al. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2005. – Vol. 11, № 3. – P. 451-453.

346. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings / Q. Feng, Y. Liu, J. Huang, et al. // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1-13.

347. Varanko, A. Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery / A. Varanko, S. Saha, A. Chilkoti // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2020. – Vol. 156. – P. 133-187.

348. Vertegel, A.A. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme / A.A. Vertegel, R.W. Siegel, J.S. Dordick // *Langmuir*. – 2004. – Vol. 20, № 16. – P. 6800-6807.

349. Vitamin B2 functionalized iron oxide nanozymes for mouth ulcer healing / Y. Gu, Y. Huang, Z. Qiu, et al. // *Science China Life Sciences*. – 2020. – Vol. 63, № 1. – P. 68-79.

350. Vrettos, E.I. On the design principles of peptide–drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site / E.I. Vrettos, G. Mező, A.G. Tzakos // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – Vol. 14. – P. 930-954.

351. Wang, K. Polysaccharide-Based Biomaterials for Protein Delivery / K. Wang, M. Liu, R. Mo // *Medicine in Drug Discovery*. – 2020. – Vol. 7. – P. 100031.

352. Wáng, Y.X.J. A comprehensive literatures update of clinical researches of superparamagnetic resonance iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging / Y.X.J. Wáng, J.M. Idée // *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*.

– 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 88-122.

353. Water-soluble l-cysteine-coated FePt nanoparticles as dual MRI/CT imaging contrast agent for glioma / S.Y. Liang, Q. Zhou, M. Wang, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 2325-2333.

354. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? / J.A. Nagy, S.H. Chang, A.M. Dvorak, H.F. Dvorak // *British Journal of Cancer*. – 2009. – Vol. 100, № 6. – P. 865-869.

355. Xiujuan Fan, Guozheng Jiao, Lei Gao, Pengfei Jin, X.L. The preparation and drug delivery of a graphene-carbon nanotube-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle hybrid / X.L. Xiujuan Fan, Guozheng Jiao, Lei Gao, Pengfei Jin // *Journal of materials chemistry. B*. – 2013. – Vol. 1, № 20. – P. 2658-2664.

356. Xu, C. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications / C. Xu, S. Sun // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Vol. 65, № 5. – P. 732-743.

357. Zein, R. Physical Properties of Nanoparticles That Result in Improved Cancer Targeting / R. Zein, W. Sharrouf, K. Selting // *Journal of Oncology*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1-16.

358. Zhou, Q. For better or worse, iron overload by Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a MRI contrast agent for chronic liver diseases / Q. Zhou, Y. Wei // *Chemical Research in Toxicology*. – 2017. – Vol. 30, № 1. – P. 73-80.

359. Bulte, J.W.M. In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies / J.W.M. Bulte // *American Journal of Roentgenology*. – 2009. – T. 193, № 2. – C. 314-325.