

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)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в Научно-исследовательской лаборатории биопротезирования и кардиопротекции Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России

**Галагудза
Михаил Михайлович**

Доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии и патологии поведения ФГБУН Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН

**Багров
Алексей Яковлевич**

Официальные оппоненты

Доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории экспериментальной кардиологии Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН

**Маслов
Леонид Николаевич**

Доктор биологических наук, доцент, член-корр. РАН, заведующая Отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки России

**Шамова
Ольга Валерьевна**

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры общей и биоорганической химии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

**Шаройко
Владимир Владимирович**

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов Пермского федерального исследовательского центра УРО РАН (г. Пермь).

Защита состоится «22» июня 2022 года в 12-00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02 на базе ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106)

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (620041, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, д. 22/20) и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iip.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «___» апреля 2022 года

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02
на базе ИИФ УрО РАН, д.м.н., профессор, ЗДН РФ

И.А. Тузанкина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Тераностика представляет собой подход, одновременно сочетающий в себе диагностику и таргетную терапию различных заболеваний. 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 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 (D. Chang. et al., 2018, H. Fatima. et al., 2021, X.L. Liu. et al., 2014, Q. Zhou. et al., 2017). Данный вид наночастиц является перспективным агентом в рамках концепции тераностики, подразумевающей сочетание мультимодальной визуализации и комбинированных терапевтических подходов (S. Zhao. et al., 2020).

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 [<https://clinicaltrials.gov>]. При этом лишь единичные лекарственные формы на основе наночастиц оксида железа используются для клинического применения (K. Maier-Hauff. et al., 2007, Q. Wang. et al., 2015, J.W.M. Bulte, 2009).

На сегодняшний день не сформировано однозначного представления о механизмах, лежащих в основе взаимодействия МНЧ с биологическими объектами различного уровня (клетками, тканями, организма в целом) (R. Vakili-Ghartavol. et al., 2020). 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 (A. Kumar. et al. 2011, C.F. Jones. et al., 2009).

С учетом вышеобозначенных свойств магнитных наночастиц, их применение может быть наиболее востребованно в области онкологии (K. Ulbrich. et al., 2016). 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 (И.Л. Кляритская, 2012),

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. (X.Y. Vak. et al., 2011, J.B.A.G. Naanen. et al., 2017, H. Chen. et al., 2015), ХТ остается одним из основных методов лечения злокачественных новообразований. При этом остается актуальной 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 имплантаты, помещаемые в организм). Использование при этом способности наночастиц к локальному нагреву позволит существенно повысить эффективность лечения за счет обеспечения термической деструкции опухоли (R. Avazzadeh. et al., 2017). Также существует возможность управления дозированием препаратов за счет использования оболочки, обладающей заданными свойствами в части ее деградации с обеспечением при этом контролируемого высвобождения цитостатика (D.H. Nguyen, 2018). 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 (Hai-Shan Yang, et al., 2005).

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 Скориков 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Этические нормы. Эксперименты на животных выполнены с учетом международных правил и рекомендаций, соответствие которым подтверждено Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных Центра Алмазова (Протокол-заявка 17-1 от 06.03.2017). Эксперименты на человеке проведены на крови здоровых добровольцев в соответствии с Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2013 ред.).

Животные. Животные содержались в условиях вивария при стандартном суточном свето-темновом режиме со свободным доступом к воде и пище. В

исследовании использовались половозрелые крысы стока Wistar весом 240-280 г, а также мыши массой 19-24 г с глубоким иммунодефицитом NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/Szj, Jackson Laboratory, США). Животных наркотизировали изофлюраном, эвтаназию осуществляли посредством его передозировки. Введение наночастиц осуществляли в латеральную хвостовую вену.

Магнитные наночастицы. В работе использованы наночастицы с немодифицированной поверхностью: наночастицы магнетита (МНЧ1), композитные наночастицы оксида железа с оболочкой из диоксида кремния (МНЧ2), композитные наночастицы оксида железа с ядром из диоксида кремния (МНЧ3). Для модификации поверхности с помощью нанесения оболочек использовались наночастицы магнетита с оболочками на основе полиэфира молочной кислоты (полилактида, МНЧ+полилактид), на основе поликонденсированной глюкозы (МНЧ+глюкоза), на основе альбумина (МНЧ+альбумин), а также наночастицы магнетита с оболочками на основе полиэфира молочной кислоты (полилактида) с включенным в состав оболочки флуоресцентным агентом – индоцианином зеленым (ИЦЗ, ИЦЗ-МНЧ). Все виды наночастиц были получены в НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» Минздрава России с использованием модифицированного реактора идеального смешения периодического действия с емкостью резервуара 2000 мл (УНСЕМ, Китай). Для приготовления всех видов МНЧ использовались реактивы Sigma-Aldrich (США). Для приготовления рабочих концентраций МНЧ использовали физиологический раствор (ФР).

Определение физико-химических характеристик МНЧ. Размер, форму и морфологию МНЧ оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (JEM-2010, JEOL, Япония), а также методом динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Статические магнитные свойства МНЧ изучали с помощью вибрационного магнитометра Lake Shore 7410 (Lake Shore Cryotronics Inc., США). Анализ элементного состава МНЧ выполнен с использованием энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного спектрометра EDX 800 HS (Shimadzu, Япония). Дзета-потенциал МНЧ исследовали методом электрофоретического рассеяния света. Этапы исследования отражены на рисунке 1.

Исследование влияния МНЧ на морфологию и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека (культура HUVEC). Культивирование клеток проводили с использованием набора Endothelial Cell Culture Medium Kit (BD Bioscience, США). Клетки высевали с плотностью $5 \times 10^3/\text{см}^2$ на желатинизированные планшеты в условиях CO_2 -инкубатора при 37°C (5% CO_2) в 12-луночном планшете. Каждая лунка содержала приблизительно 100×10^3 клеток в 100 мкл культуральной среды. В лунки вносили суспензию МНЧ1 или МНЧ2 или МНЧ3 в объеме 0,1, 1, 10 мкл, что соответствовало дозам 0,7, 7 и 70 мкг МНЧ/на лунку. В контрольные лунки добавляли соответствующий объем ФР для каждой концентрации. Через 48 часов проводили визуализацию морфологических изменений клеток на инвертированном микроскопе AxioStar Carl Zeiss (Германия) при прямой и фазово-контрастной микроскопии (ув. $\times 50$). HUVEC удаляли с поверхности планшета смесью трипсин-версен (Lonza Bioscience, Rockland, USA). Оценку размера и гранулярности клеток, их жизнеспособности проводили методом проточной цитометрии (Guava EasyCyte 8, Millipore).

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

Цель – определить виды МНЧ, обладающие наименьшими повреждающими эффектами



Сравнительное исследование эффектов 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



Подтверждение возможности магнитоуправляемой доставки лекарств с помощью МНЧ
(стендовые условия, in vivo)

Рисунок 1 – Этапы исследования

Примечание: МНЧ – наночастицы оксида железа

Количественная оценка показателей периферической крови крыс при однократном внутривенном введении магнитных наночастиц оксида железа (МНЧ). МНЧ в виде суспензии (0,7 мг/мл) вводились самцам крыс в объеме 1 мл (n=15 в каждой опытной группе). Через 3, 6 и 24 часа после однократного внутривенного введения осуществляли взятие крови из десны и проводили гематологический анализ с помощью анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия).

Исследование влияния МНЧ в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз, агрегацию эритроцитов и продукцию АФК. Гепаринизированную кровь человека инкубировали при постоянном перемешивании с равным объемом суспензии МНЧ1 или МНЧ2 в концентрациях 0,2, 2,0 и 20,0 мг/мл. Генерацию АФК регистрировали с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) на хемилюминометре Lum-1200 (ДИСофт, Россия), с оценкой максимальной интенсивности (I_{max}) и полной светосуммы (S) свечения сразу после добавления МНЧ (исходный уровень), а также через 1, 2,5 и 5 часов инкубации. Перед оценкой индекса агрегации эритроцитов (ИАЭ, %) под дно пробирки на 3 минуты устанавливали постоянный магнит для изоляции МНЧ из взвеси. Для анализа производили забор образца из нижнего слоя осевших за 3 минуты эритроцитов. Вычисляли ИАЭ с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse E-200 (Япония) как число агрегатов к количеству свободных клеток, усредняя значения из 3-х больших квадратов камеры Горяева (Гущин и др., 2011). Оценку гемолитической активности МНЧ осуществляли на спектрофотометре SQ-2802S (UNICO, США). Коэффициент гемолиза (КГ) рассчитывали по формуле: $КГ, \% = (ОП_{оп} - ОП_{нк}) / (ОП_{пк} - ОП_{нк}) \times 100\%$, где ОП —

оптическая плотность, нк – отрицательный контроль (образец с добавлением ФР), пк - положительный контроль (образцы со 100%-ным гемолизом, вызванным добавлением 0,01% раствора додецилсульфата натрия при соотношении образец:реагент 1:10), оп – опытный образец.

Исследование влияния МНЧ на морфофункциональное состояние сосудов, сократительную и релаксационную функции артерий. Через 1 час после однократного внутривенного введения самцам крыс производили эвтаназию и выделяли участки артерий брыжейки 2-3-го порядка. Оценку функциональной активности эндотелия проводили на проволочном миографе (DMT 620M, Дания). Для оценки сократительной функции использовали фенилэфрин (ФЭ) в концентрациях 0,1 - 10 мкМ. Для оценки релаксации осуществляли предварительное сокращение сосуда ФЭ на 60% от максимального, затем воздействовали ацетилхолином (АХ, 0,1 - 10 мкМ) по аналогичной сократительному ответу схеме до момента полного расслабления или отсутствия дальнейшей реакции. В рамках оценки морфофункционального состояния сосудов осуществляли взятие крови из задней полой вены для оценки уровня NO методом ИФА-анализа с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора ChemWell 2910 (AwarenessTechnology, США), забор сосудов брыжейки тонкой кишки для гистологического исследования образцов, окрашенных гематоксилином и эозином и по Перлсу с целью выявления Fe^{3+} . При изучении немодифицированных МНЧ n=4 для каждого вида МНЧ, для исследования модифицированных МНЧ - n=9.

Исследование влияния внутривенного введения МНЧ на вазомоторные реакции, системную гемодинамику и микроциркуляцию у крыс в условиях изменяющейся скорости кровотока. У наркотизированных самцов крыс (n=10 в каждой группе) обеспечивали доступ к брюшной аорте. Контур циркуляции перфузионного насоса роликового типа с регулируемой производительностью заполняли плазмозамещающим средством «Гелофузин» (6,0% с гепарином). 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 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). Далее производили кратковременные ступенчатые 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 однократно вводили в/в МНЧ1 с последующей 20-минутной стабилизацией при открытом шунте. Затем повторяли восходящую и нисходящую ступени с регистрацией обозначенных выше показателей (опытные значения при повышении и понижении ПД). Регистрировали параметры гемодинамики: среднее артериальное давление (САД), частоту сердечных

сокращений (ЧСС) с помощью оригинального программного обеспечения PhysExp (ООО «Кардиопротект», Россия). Микроциркуляцию оценивали в участке тыльной стороны правой задней конечности в области между фалангами 1 и 2 пальца методом лазерной доплеровской флоуметрии с помощью анализатора ЛАКК-02 (НПП «Лазма», Москва) по среднему арифметическому показателю микроциркуляции (М, п.е.), среднеквадратичному отклонению амплитуды колебания кровотока (флакс, σ , п.е.) и коэффициенту вариации (К_v, %). В конце эксперимента производили взятие крови из задней полой вены для оценки уровня оксида азота (NO) и эндотелина-1 методом ИФА-анализа. Животных эвтаназировали, выделяли бедренные и брыжеечные артерии для дальнейшего исследования вазореактивности с помощью вышеописанного метода проволоочной миографии. Контролем при оценке параметров гемодинамики и микроциркуляции являлись животные, находящиеся в условиях управляемой перфузии до введения МНЧ (исходные показатели). Контролем при оценке вазомоторных реакций и регуляторной активности эндотелия (NO и эндотелин-1) являлись интактные животные.

Исследование органного распределения МНЧ. Через 1, 3, 6 и 24 часа после однократного внутривенного введения самцам крыс МНЧ1 или МНЧ2 осуществляли эвтаназию животных, после чего производили взятие печени, сердца, почек, селезенки, головного мозга, легких (n=5 в каждой дискретной точке). Контролем являлись интактные крысы, содержание железа в органах которых принималось за эндогенные уровни данного микроэлемента, а органное распределение введенных МНЧ оценивали с учетом его вычитания. Органы промывали от крови в ФР, лиофилизировали в лиофильной сушке ZirBus VaCo 2 (Германия) при температуре 50°C, взвешивали, после чего заливали 20 мл 70% азотной кислоты и 20 мл дистиллированной водой и кипятили на колбонагревателе в течение 1 часа для обеспечения полной минерализации, после чего объем доводили до 100 мл. Полученный раствор анализировали на совместное содержание катионов Fe²⁺ и Fe³⁺ на спектрофотометре SQ-2802S (UNICO, США) в присутствии сульфосалициловой кислоты в аммиачной среде согласно ГОСТ 35514-2013, ГОСТ 26473.3-85, ГОСТ 11930.7-79.

Исследование системных эффектов одно- и многократного внутривенного введения крысам МНЧ. Осуществляли однократное внутривенное введение самцам и самкам крыс МНЧ1 или МНЧ2 в дозе 400,0 мг/кг и многократное внутривенное введение в дозах: 30,0 мг/кг и 60,0 мг/кг (МНЧ1) и 10,0 мг/кг и 30,0 мг/кг (МНЧ2) (один раз в сутки в течение 7 дней). Оценивали динамику выживаемости, массы тела, потребления воды и корма, компонентного состава тела с помощью МР-релаксометрии (система Echo Medical Systems' EchoMRI™ Whole Body Composition Analyzer), гематологических, биохимических (общий белок, глюкоза, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), общий билирубин) показателей крови, показателей свертываемости крови с помощью коагулометра HumaClot Duo Plus с использованием реагентов Hemostat (Human GmbH): протромбиновое время (ПТ), концентрация фибриногена, тромбиновое время (ТТ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ); плазменных уровней моноцитарного хемотаксического фактора MCP-1 и цитокина IL-1 β методом ИФА-анализа. На 31-е сутки после введения МНЧ проводили анализ мочи с использованием экспресс-анализатора мочи DocUReader 2 Pro (77 Elektronika, Венгрия) при помощи тест-полосок LabStrip U11 Plus (77 Elektronika, Венгрия), после чего крыс эвтаназировали, определяли массовые коэффициенты

органов, а также изучали морфологию печени, селезенки, почек и легких. Для обнаружения ионов Fe^{3+} использовали гистохимический способ Перлса. При однократном введении: n=16 (8 самок+8 самцов) – в опытных группах, n=10 (5 самок+5 самцов) – в группах контроля. При многократном введении: n=24 (6 самок+6 самцов на каждую из доз) – для МНЧ1 и n=26 (6 самок+6 самцов на дозу 10,0 мг/кг и 7 самок+7 самцов на дозу 30,0 мг/кг) – для МНЧ2.

Исследование влияния МНЧ на гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях *in vivo* и *ex vivo* при наличии внешнего магнитного поля. При проведении экспериментов *in vivo* обеспечивали доступ к органам наркотизированных самцов крыс с помощью торакотомии и лапаротомии (n=9 в каждой экспериментальной группе). В течение 10 минут осуществляли внутривенное введение МНЧ1 или МНЧ2. Магнит размещали в области сердца крысы с момента начала введения МНЧ и в течение 10 минут после окончания их введения. Исходно, в процессе введения МНЧ, а также в течение часа после их введения с интервалом в 10 минут определяли показатели микроциркуляции, указанные выше (M, σ и Kv) в сердце, печени, селезенке и почках с помощью поверхностного датчика (диаметр 10 мм) лазерного доплеровского флоуметра (ЛДФ) BLF 21 (Transonic Systems Inc., США), а также регистрировали ЧСС и САД (Кардиопротект, Россия).

В экспериментах *ex vivo* использовали изолированные сердца самцов крыс (n=8 в каждой экспериментальной группе), перфузируемых оксигенированным раствором Кребса – Хензеляйта (К-Х): 20 мин. адаптации + интракоронарное введение МНЧ1 или МНЧ2 в течение одной минуты + 15 мин. перфузии. Исследование проводили при наличии внешнего магнитного поля, создаваемого соленоидом со следующими характеристиками: длина соленоида - 0,02 м, радиус - 0,018 м, сила тока - 0,469 А, число витков в катушке - 500. Центр катушки соленоида располагался на расстоянии 2,5 см от изолированного сердца. Воздействие магнитным полем осуществляли с момента начала введения и до 4-ой минуты после окончания введения МНЧ. На этапах адаптации, окончания введения и на момент окончания эксперимента регистрировали показатели сократительной активности сердец. На момент окончания адаптации и на этапе окончания эксперимента оценивали коронарный проток (КП, мл/мин.). Оценивали накопление МНЧ в миокарде спектрофотометрическим методом (см. выше).

Исследование токсических эффектов МНЧ при их однократном внутривенном введении крысам. Осуществляли однократное внутривенное введение МНЧ с различными оболочками самцам крыс стока SpragueDawley в дозах 200,0, 100,0, 50,0 и 25,0 мг/кг (n=5 для всех использованных доз МНЧ+альбумин, МНЧ+полисахарид, а также для МНЧ+полилактид в дозах 50,0 и 25,0 мг/кг. Для доз МНЧ+полилактид 100,0 и 200,0 мг/кг в группы было включено по 10 животных). После введения МНЧ 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 из задней полой вены непосредственно перед эвтаназией и анализировали с помощью автоматического гематологического анализатора URIT – 3000 (URIT Medical Electronic Group Co., Ltd, КНР). При вскрытии животных проводилась макроскопическая оценка патоморфологических изменений, определялась масса органов, а также производился сбор коллекции органов (головной мозг, печень, почки, надпочечники, селезенка, сердце, трахея, легкие, яички) для последующего гистологического анализа при наличии

макроскопических изменений, а также при изменении массы органов. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Экспериментальное подтверждение возможности использования МНЧ для их магнитоуправляемой доставки в ткань (ex vivo, in vivo). Исследования ex vivo проводились на модифицированном гидродинамическом стенде, разработанном в ИЭМ Центра Алмазова, представляющем замкнутый контур, в одном из участков которого расположен сосудистый модуль, с помощью которого можно определять относительную проницаемость сосудов. Движение модельной жидкости по контуру с сосудистым модулем обеспечивали перистальтическим насосом. В ходе экспериментов поддерживали газификацию и необходимый температурный режим, давление, расход жидкости, уровень рН. Камера с сосудами состояла из трех емкостей: одного внешнего большого и двух малых емкостей, через которые проходят рукава центрального контура. Канюли помещались внутрь небольших контейнеров, на которые нанизывались сосуды, плотно привязанные нитями к носикам канюль. Пространство между большой емкостью и малой заполнялось дистиллированной водой постоянной температуры. Пространство внутри малых емкостей заполняли раствором К-Х для поддержания жизнедеятельности сосуда. В накопительной емкости также находился раствор К-Х. В качестве модельной системы были использованы сонные артерии самцов крыс. 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 небольших камер на расстоянии 1 см от участка с сосудом, торцом к стенке сосуда. Мощность роликового насоса была выставлена на 50%, что соответствовало скорости 17 см/сек. Спустя 1 час после введения МНЧ отбирался раствор из малой камеры. В качестве контрольного измерения забирался раствор из малой камеры, в которой отсутствовал постоянный магнит. Концентрацию наночастиц определяли спектрофотометрически при помощи UV-Vis спектрофотометра Unico 2802S (United Products & Instruments, США).

Исследование in vivo выполнено на наркотизированных самцах мышей на модели опухолевого процесса, индуцированного введением под кожу бедра 5 миллионов клеток линии HeLa в 200 мкл (50% среда + 50% Матригель). Рост опухоли контролировали каждые три дня с помощью электронного штангенциркуля. Через 1 и 15 минут после в/в введения мышам 0,1 мл ИЦЗ-МНЧ в концентрации 0,7 мг/мл оценивали накопление МНЧ в опухолевой ткани методом флуоресцентной томографии на биоимиджере IVIS Lumina LT Series III (PerkinElmer Inc., США). Измерения проводили троекратно для каждого животного (n = 9). Мышам опытной группы предварительно имплантировали постоянный цилиндрический магнит в мышечную ткань в непосредственной близости от опухоли. Контролем служили интактные животные. В качестве сравнения использовались мыши с опухолевым процессом без имплантации магнита с внутривенным введением МНЧ.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistica 10.0. Проверку гипотезы о равенстве средневыворочных 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 (Emax, %). 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 LD50 осуществляли пробит-анализом методом Литчфилда и Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические свойства экспериментальных образцов магнитных наночастиц оксида железа (МНЧ) различного состава

МНЧ1 имели форму стержней со средними размерами $10,5 \pm 2,6$ нм (диаметр) и $42,7 \pm 6,8$ нм (длина), тогда как МНЧ2 и МНЧ3 были сферической формы со средним диаметром $98,0 \pm 22,0$ и $101,0 \pm 19,0$ нм, соответственно. МНЧ2 и МНЧ3 не агрегировали, в то время как МНЧ1 характеризовались значительной агрегацией. МНЧ1 обладали массовой намагниченностью насыщения равной $37,2$ emu/g, тогда как массовая намагниченность насыщения МНЧ2 и МНЧ3 оценивалась в $11,0$ emu/g, что, вероятно, обусловлено наличием немагнитных включений кремнезема. Отсутствие петли гистерезиса на кривых намагничивания для всех видов МНЧ свидетельствует об их суперпарамагнитном поведении.

Ранний скрининг немодифицированных магнитных наночастиц по оценке их влияния на морфологию и жизнеспособность эндотелиоцитов человека и показатели периферической крови крыс

Исходя из планируемого внутрисосудистого введения МНЧ при их дальнейшем клиническом использовании, в качестве клеток-мишеней для оценки их повреждающего эффекта были выбраны эндотелиоциты человека (HUVEC).

В дозе $0,7$ мкг/лунку МНЧ не оказывали влияния на размер и структуру клеток (*рисунок 2Г, Ж, К и рисунок 3Г,Ж,К*), однако увеличение дозы МНЧ до $7,0$ мкг/лунку приводило к значительным изменениям морфологии и гранулярности клеток без изменений их размера (*рисунок 3Д, З, Л*), наблюдалось образование внеклеточных агрегатов МНЧ различной формы и размера (*рисунок 2Д, З, Л*).

При воздействии всех видов МНЧ в дозе $70,0$ мкг/лунку визуализировалось большое количество конгломератов частиц, клетки наблюдались в единичных количествах (*рисунки 2И, М; 3И, М*). Наиболее выраженными изменения были при применении МНЧ3, наименее выраженными при действии МНЧ1. При воздействии МНЧ1 в зоне гейтирования фиксировался остаточный клеточный пул уменьшенного размера со значительно увеличенной гранулярностью (*рисунок 3Е*).

Одной из возможных причин снижения жизнеспособности клеток с увеличением дозы МНЧ может быть активная интернализация наночастиц и перенасыщение ими клеток, что, в свою очередь, индуцирует генерацию АФК, повреждение мембран, нарушение функции митохондрий и т.д., обуславливая в конечном счете повреждение клетки (U.O. Hafeli. et al., 2009, J.M. Veranth. et al., 2007).

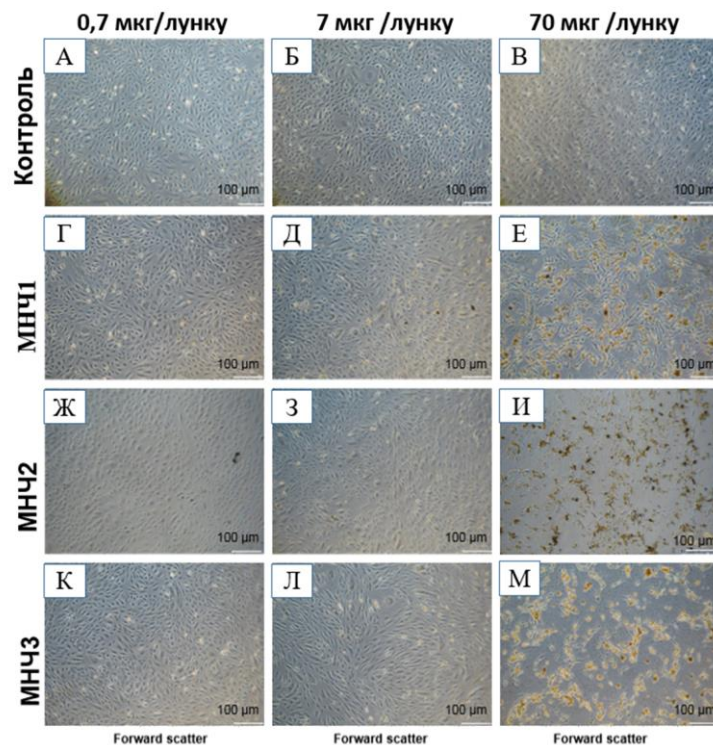


Рисунок 2 - Морфологическая картина эндотелиальных клеток через 48 часов инкубации с различными дозами немодифицированных магнитных наночастиц
Примечание: МНЧ1 - наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния; МНЧ3 – композитные наночастицы с ядром из диоксида кремния. 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. $\times 50$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наилучшим профилем биосовместимости обладали 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 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 (В.И. Альмяшев и соавт., 2014), а также отсутствием инертной оболочки на поверхности оксидных наночастиц.

Для исследования влияния МНЧ 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.

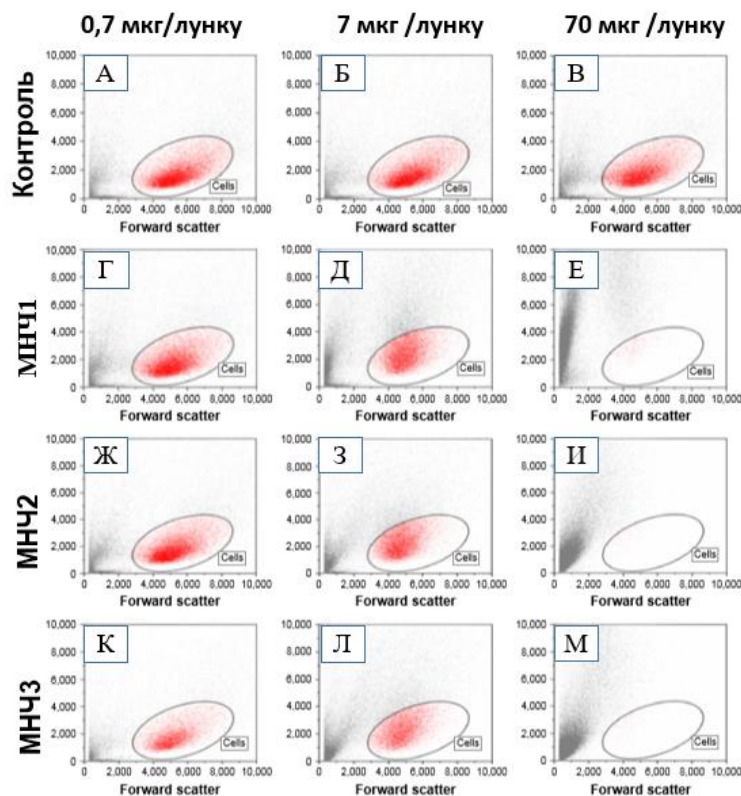


Рисунок 3 - Изменение морфологии и гранулярности клеток HUVES через 48 часов инкубации с наночастицами (оригинальные данные проточной цитометрии)

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

Полученные результаты гематологического анализа показали отсутствие значимых изменений показателей периферической крови на фоне воздействия MNЧ, которые в ходе эксперимента (3, 6 и 24 часа) находились в пределах физиологической нормы.

Таким образом, проведенный скрининг эффектов немодифицированных MNЧ показал, что при однократном внутривенном введении суспензии всех видов MNЧ 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 MNЧ демонстрируют дозозависимые цитотоксические эффекты, выраженность которых зависит от их состава. Наиболее значительным повреждающим эффектом в отношении клеток HUVES обладают MNЧ3. В связи с этим в следующих сериях экспериментов были использованы MNЧ1 и MNЧ2.

Исследование влияния немодифицированных магнитных наночастиц в динамике их взаимодействия с кровью человека на гемолиз и агрегацию эритроцитов и продукцию активных форм кислорода

Эксперименты проводили на образцах гепаринизированной крови человека, к которым в соотношении 1:1 добавляли суспензию MNЧ1 или MNЧ2 в концентрациях 0,2, 2,0 и 20,0 мг/мл.

Общее количество эритроцитов в контрольных и опытных образцах после осаждения МНЧ с помощью магнита не различалось. В условиях 2,5-часового воздействия МНЧ1 и МНЧ2 наблюдалось снижение степени агрегации эритроцитов (ИАЭ), при этом МНЧ1 обладали более выраженным эффектом (рисунки 4А, Б). Через 5 часов инкубации при использовании всех доз МНЧ отмечался гемолиз, не позволивший провести оценку ИАЭ.

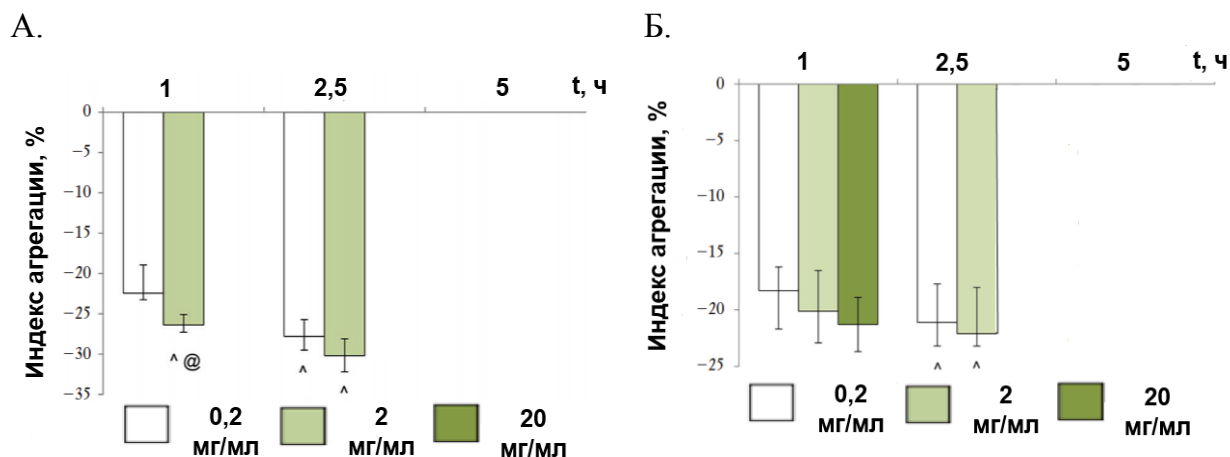


Рисунок 4 - Изменение агрегации эритроцитов под влиянием немодифицированных магнитных наночастиц

Примечание: А. МНЧ1 – наночастицы магнетита; Б. МНЧ2 композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. 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 разрушение эритроцитов (рисунки 5 А,Б).

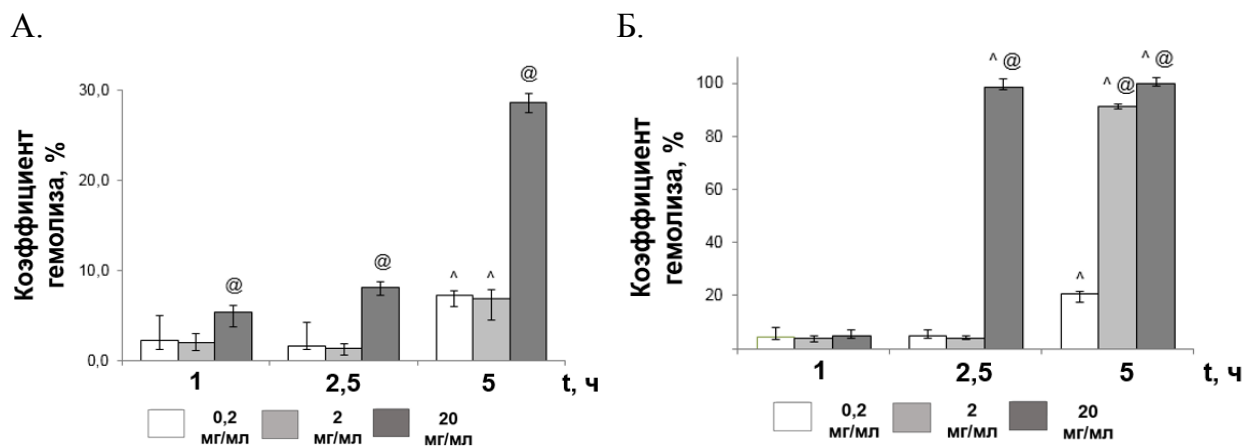


Рисунок 5 - Коэффициент спонтанного гемолиза в условиях воздействия немодифицированных магнитных наночастиц

Примечание: А. МНЧ1 – наночастицы магнетита; Б. МНЧ2 композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. [^]P < 0,05 между МНЧ1 и МНЧ2 одной концентрации; [@]P < 0,05 по сравнению с меньшей концентрацией МНЧ того же типа.

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.

Продемонстрированный гипоагрегационный эффект МНЧ нельзя рассматривать как токсический/лизирующий эффект на эритроциты, реализуемый за счет уменьшения их количества в среде. В пользу данного утверждения свидетельствует отсутствие гемолитического эффекта при использовании МНЧ в концентрациях 0,2-2,0 мг/мл через 1 и 2,5 часа. Можно предполагать, что гипоагрегационный эффект МНЧ реализуется за счет изменения заряда мембраны эритроцитов или образованием белковой оболочки на поверхности наночастиц. Гемолитическая активность наночастиц может быть связана с механическим повреждением ими мембраны эритроцитов и/или с конформационными перестройками гемоглобина (М.Ю. Скоркина и др., 2010).

Для исследования возможной роли свободнорадикального механизма в реализации гемолитического эффекта МНЧ проводили эксперименты с оценкой динамики величины хемилюминесценции (ХЛ) крови, как показателя общего уровня АФК, в условиях воздействия МНЧ. В образцах крови контрольной группы через 1 час наблюдали повышение параметров спонтанной ХЛ ($p < 0,05$ по сравнению с исходным), сохраняющееся в ходе всего эксперимента. На момент окончания эксперимента (5 часов) в данной группе показатели I_{max} и S составили 20,4 [15,2;25,7] имп./с и 6102,7[4229,1;7976,3] имп., соответственно. На фоне воздействия МНЧ наблюдалось снижение ХЛ, увеличивающееся при повышении дозы МНЧ и времени их воздействия. При использовании МНЧ в дозе 20,0 мг/мл через 5 часов инкубации параметры ХЛ оказались на значимо более низком уровне относительно контрольных значений для данного этапа эксперимента, при этом МНЧ2 оказывали больший эффект в сравнении с МНЧ1 ($p < 0,05$). После 5 часов инкубации I_{max} и S для данных групп составили: 8,5[5,3;11,9] имп./с и 2715,8[2128,4;4058,5] о.е. (МНЧ1) и 2,0[1,7;2,4] имп./с и 667,5[569,6;765,4] о.е. (МНЧ2). Можно предположить, что в основе снижения уровня АФК крови при действии МНЧ лежит постепенное снижение их реакционной способности в процессе инкубации вследствие формирования на их поверхности оболочки, состоящей из белков крови, а также компенсаторное повышение активности антиоксидантных систем плазмы крови или связывание свободных радикалов самими МНЧ.

Таким образом, в условия *ex vivo* МНЧ1 и МНЧ2 вызывают дозозависимый гемолиз эритроцитов, а также снижают спонтанную ХЛ цельной крови. МНЧ2 оказывают более выраженный по сравнению с МНЧ1 эффект в отношении снижения генерации активных форм кислорода и разрушения эритроцитов.

Сократительная и релаксационная функции артерий в условиях введения крысам немодифицированных магнитных наночастиц

Исследования *in vitro*, формируя первичное представление об оказываемых эффектах МНЧ, не позволяют учесть влияние организменных факторов, включающих степень проницаемости сосудов, взаимодействие МНЧ с белками крови и т.д. В связи с этим следующий этап исследования был направлен на исследование влияния внутривенного введения немодифицированных 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 МНЧ в объеме 2 мл. На

фоне введения МНЧ1, но не МНЧ2, отмечалось снижение реакции сосудов на фенилэфрин (ФЭ) в диапазоне концентраций 1-3 мкМ (таблица 1, рисунок 6А).

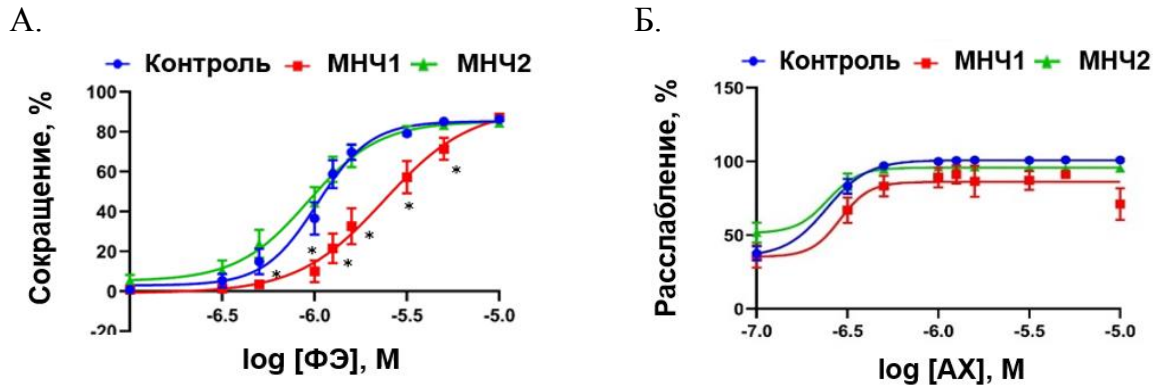


Рисунок 6 - Кумулятивная кривая «концентрация-ответ»

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

При использовании максимальной концентрации ФЭ сократительные ответы во всех экспериментальных группах не различались (таблица 1). Параметры LogEC50 и Emax для ацетилхолина (АХ) (0,1-1,5 мкМ) в группах МНЧ1 и МНЧ2 были близки по значению, не отличаясь при этом от контроля (таблица 1).

Таблица 1 - Значения логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа LogEC50 и максимальной величины ответа Emax в группах с введением немодифицированных магнитных наночастиц

	ФЭ		АХ	
	LogEC50, M	Emax, %	LogEC50, M	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. *P < 0,0001.

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

В основе изменений сократительной активности сосудов при действии МНЧ1 могут лежать различные механизмы, которые могут быть реализованы на пререцепторном, рецепторном и пострецепторном уровнях формирования ответа на воздействие агониста. Нельзя исключить также повреждающего влияния избыточного железо-опосредованного образования АФК при внутривенном введении МНЧ. Возможность механического повреждения стенки сосудов при внутривенном введении МНЧ1, характеризующихся игольчатой формой, маловероятна, поскольку релаксационная функция сосудов сохранялась.

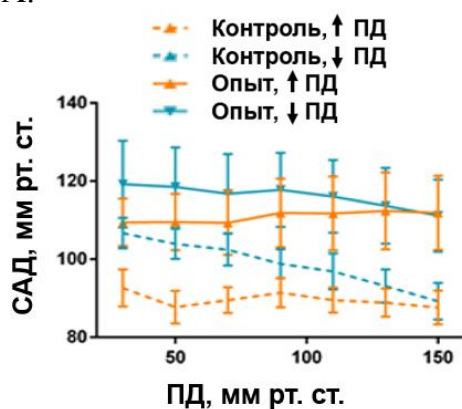
В связи с выявленным влиянием МНЧ1 на сократительную активность артерий данный вид наночастиц был применен при исследовании сосудистых эффектов при внутривенном введении крысам в условиях изменяющейся скорости кровотока.

Влияние внутривенного введения наночастиц магнетита 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 МНЧ1 (2,0 мг/мл, 2 мл в течение 2 мин.) и повторяли повышение и снижение ПД в указанных пределах (опыт).

В ходе эксперимента на фоне введения МНЧ1 величины среднего артериального давления (САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) оставались на уровне исходных значений как при увеличении, так и при снижении ПД (рисунки 7А,Б).

А.



Б.

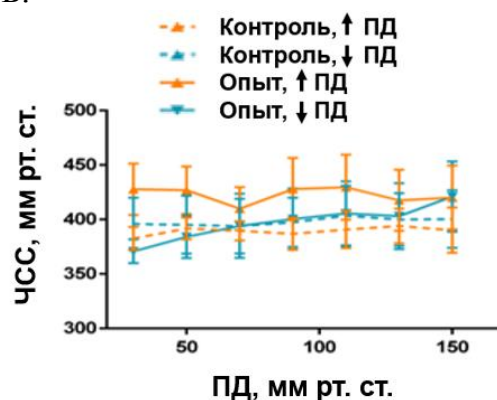


Рисунок 7 - Динамика параметров гемодинамики у крыс в условиях повышения и снижения перфузионного давления в сосудистом регионе задней четверти туловища
Примечание: А. систолическое артериальное давление, САД; Б. частота сердечных сокращения, ЧСС.

До введения крысам МНЧ1 при увеличении перфузионного давления (ПД) отмечалось повышение уровня микроциркуляции (М), измеряемое лазерной доплеровской флоуметрией, и его снижение при уменьшении ПД, что являлось свидетельством адекватной регуляции кровотока. При введении МНЧ1 отмечалась тенденция к меньшему нарастанию (в условиях повышения ПД) и более выраженному снижению (в условиях снижения ПД) уровня микроциркуляции (М) по сравнению с контрольными значениями (рисунки 8).

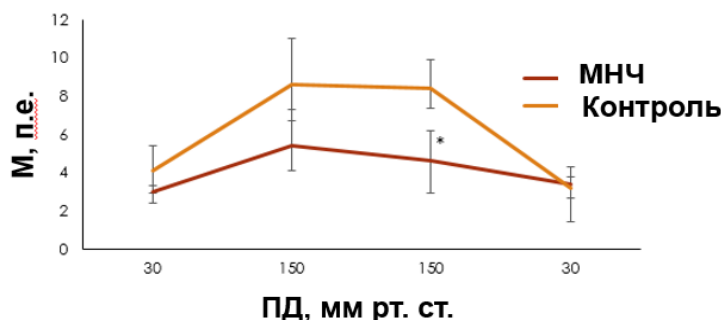


Рисунок 8 - Динамика уровня микроциркуляции у крыс в условиях увеличения и снижения в перфузионного давления

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

На момент окончания эксперимента уровень М при введении МНЧ1 был близок к контрольным значениям. Уровень флакса, характеризующий модуляцию кровотока за счет пассивных и активных механизмов, и коэффициент вариации, указывающий на процентный вклад активных факторов регуляции в общую модуляцию тканевого кровотока, в ходе изменения ПД в экспериментальных группах значимо не изменялись и на момент окончания эксперимента данные показатели на фоне введения МНЧ не отличались от контрольных значений, что косвенно свидетельствует о сохранности (или постепенном восстановлении) в условиях влияния МНЧ механизмов регуляции тканевого кровотока.

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. 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.

При введении МНЧ1 не наблюдалось значимых изменений сократительной и релаксационной способности бедренных артерий (рисунки 9А,Б).

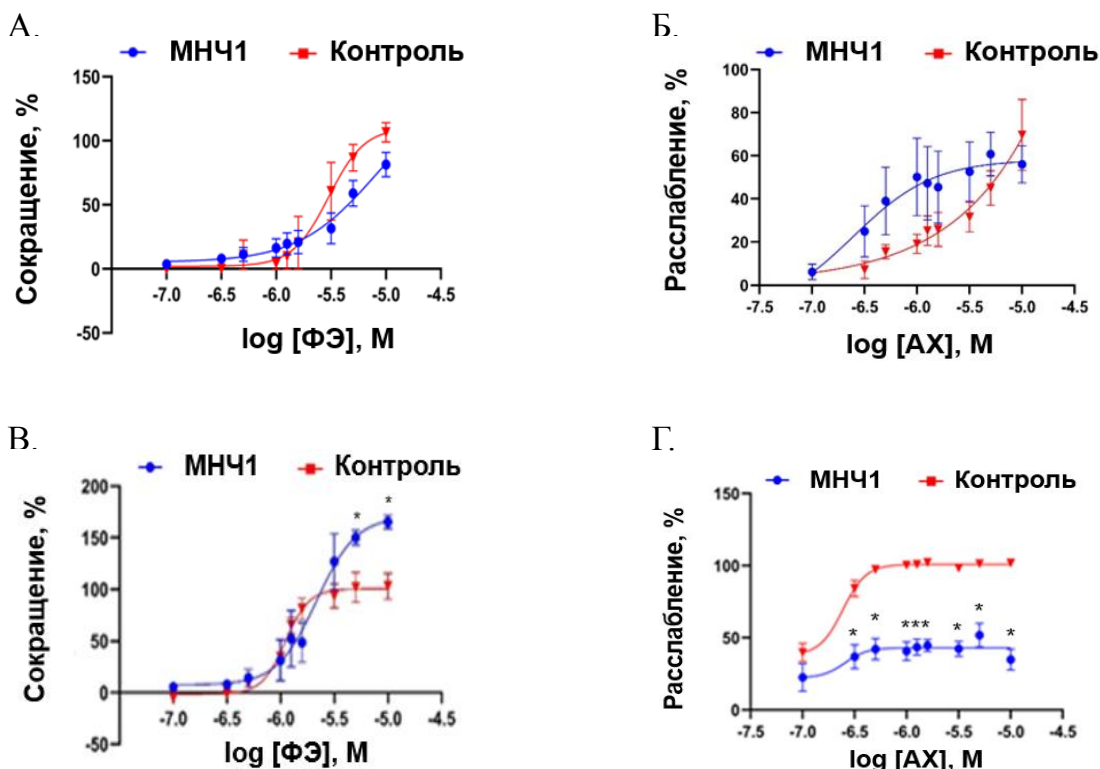


Рисунок 9 - Кумулятивная кривая «концентрация-ответ»

Примечание: А, Б. Бедренные артерии; В, Г. Сосуды брыжейки. МНЧ1 – наночастицы магнетита. ФЭ-фенилэфрин; АХ – ацетилхолин. * $P < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями.

При этом на фоне воздействия МНЧ1 отмечалось значимое снижение релаксационной функции и усиление способности к сокращению сосудов брыжейки (рисунки 9В,Г). Концентрации фенилэфрина (ФЭ) и ацетилхолина (АХ),

обеспечивающие максимальную величину ответа (E_{max}) сосудов брыжейки, достоверно превышали таковые для сосудов интактных животных (таблица 2).

Таблица 2 - Значения логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа LogEC_{50} и максимальной величины ответа E_{max} для сосудов различных регионов крысы

Агонист	Показатель	МНЧ	Контроль
Бедренные артерии			
ФЭ	Log EC_{50} , М	$-5,09 \pm 0,71$	$-5,52 \pm 0,09$
	E_{max} , %	$81,34 \pm 9,54$	$106,57 \pm 7,54$
АХ	Log EC_{50} , М	$-6,60 \pm 1,11$	$-5,36 \pm 0,07$
	E_{max} , %	$60,76 \pm 10,15$	$77,22 \pm 13,88$
Артерии брыжейки			
ФЭ	Log EC_{50} , М	$-5,66 \pm 0,80$	$-5,96 \pm 0,03$
	E_{max} , %	$165,33 \pm 6,51^{**}$	$102,92 \pm 12,65$
АХ	Log EC_{50} , М	$-6,59 \pm 0,44$	$-6,61 \pm 0,08$
	E_{max} , %	$51,85 \pm 8,28^*$	$102,24 \pm 0,72$

Примечание: МНЧ1 – наночастицы магнетита. ФЭ – фенилэфрин; АХ- 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 NO, играющих значимую роль в гомеостазе сосудов.

Уровень эндотелина-1 в группе животных с введением МНЧ не отличался от уровня контрольных животных, при этом уровень NO оказался достоверно выше относительно группы контроля ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о сохранности регуляторной функции эндотелия, эффекты которой направлены на поддержание механизмов вазорелаксации и вазоконстрикции 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, артерии брыжейки, не подверженные прямым изменениям скорости кровотока, в условиях воздействия МНЧ демонстрировали снижение релаксационной функции, что может отражать влияние наночастиц на механизмы вазорелаксации, реализующиеся на уровне резистивных сосудов.

Таким образом, в условиях изменяющейся скорости кровотока сосудистые эффекты наночастиц отличаются в различных сосудистых регионах, при этом наблюдаемое снижение релаксационной и повышение сократительной активности сосудов брыжейки в условиях воздействия МНЧ1 не вызывают нарушений на уровне центральной гемодинамики и механизмов регуляции тканевого кровотока.

Органное распределение немодифицированных магнитных наночастиц, системные эффекты их одно- и многократного внутривенного введения крысам

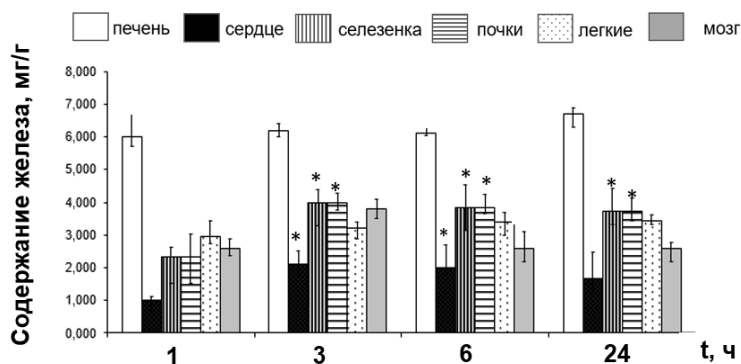
Способность МНЧ накапливаться в отдельных органах, с одной стороны, можно рассматривать как преимущество для направленного транспорта лекарств. С другой стороны, нахождение наночастиц в органах может вызывать воспаление и фиброз, а также способствовать формированию системных токсических эффектов

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. [Н. Arami et al., 2015], а также характеристики поверхности — наличие или отсутствие оболочки и ее качественный состав [Н. Chen et al., 2013], можно предполагать различную динамику распределения в организме МНЧ1 и МНЧ2, отличающихся вышеизложенными характеристиками. В связи с этим была изучена 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.

На всех этапах эксперимента максимальное накопление МНЧ1 и МНЧ2 наблюдалось в печени (рисунок 10А,Б), что, вероятно, обусловлено наличием разветвленной сосудистой сети и высокой фагоцитарной активностью клеток Купфера, а не тропностью МНЧ к данному органу.

А.



Б.

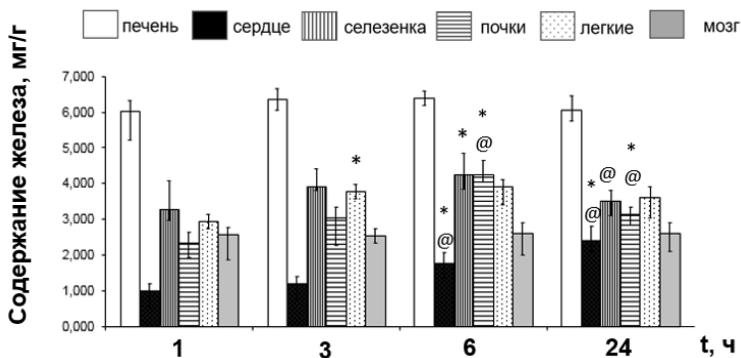


Рисунок 10 - Динамика органного распределения наночастиц при их внутривенном введении крысам

Примечание: А. МНЧ1 – наночастицы магнетита; Б. МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. * $P < 0,05$ по сравнению с этапом эксперимента, соответствующем 1 часу после введения МНЧ; @ $P < 0,05$ по сравнению предыдущим этапом эксперимента.

Также внутривенное введение МНЧ1 и МНЧ2 сопровождалось 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 (W.G. Kreyling. et al., 2002). Однако, с учетом относительно слабой развитости в почках системы мононуклеарных фагоцитов (Я. Карр, 1978) 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 (G. Oberdörster et al., 2005; G. Garçon. et al., 2006). 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.

Системные эффекты одно- и многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц крысам

При исследовании возможности использования наночастиц в качестве средства адресной доставки лекарств необходимо оценить возможные варианты режимов их введения (болюсное и многократное). Исследование системных эффектов однократного и многократного применения МНЧ и их влияния при этом на отдельные органы и системы 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 течении 5 часов с интервалом 1 час, что приравнивается к однократному введению (А.Н. Миронов, 2013).

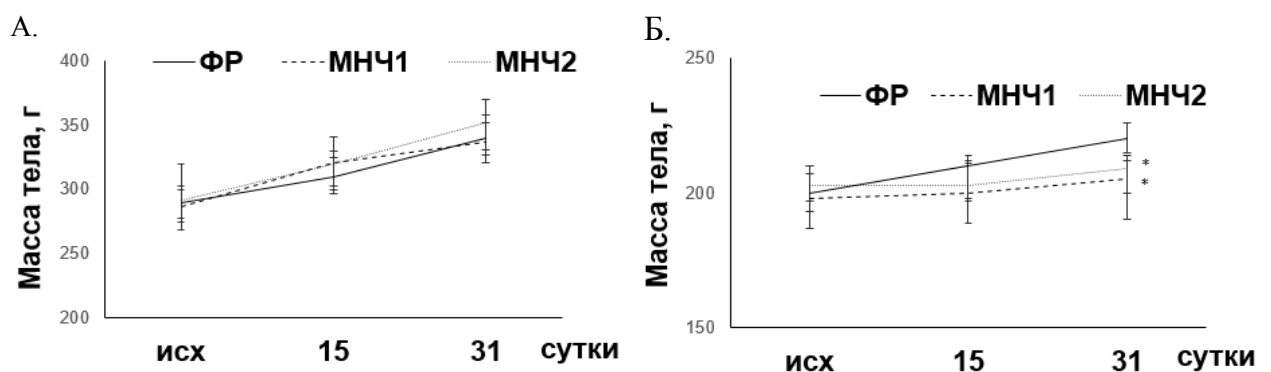


Рисунок 11 - Динамика массы тела экспериментальных животных после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

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.

При введении МНЧ1 погибло 1 животное из 16, тогда как при введении МНЧ2 - 4 из 16. В динамике исследования во всех группах наблюдалось постепенное равнозначное увеличение потребление корма, при этом на фоне введения МНЧ1 и МНЧ2 к 31 суткам отмечалось приостановление нарастания массы тела (рисунок 11А, Б).

В динамике эксперимента у крыс с введением МНЧ1 и МНЧ2 наблюдалось снижение процента жировой ткани (рисунок 12А, Б), что могло отражать токсическое влияние наночастиц.

Общее количество воды в организме крыс всех исследуемых групп в ходе эксперимента оставалось на постоянном уровне, что отражало отсутствие нарушений водного баланса в условиях воздействия МНЧ.

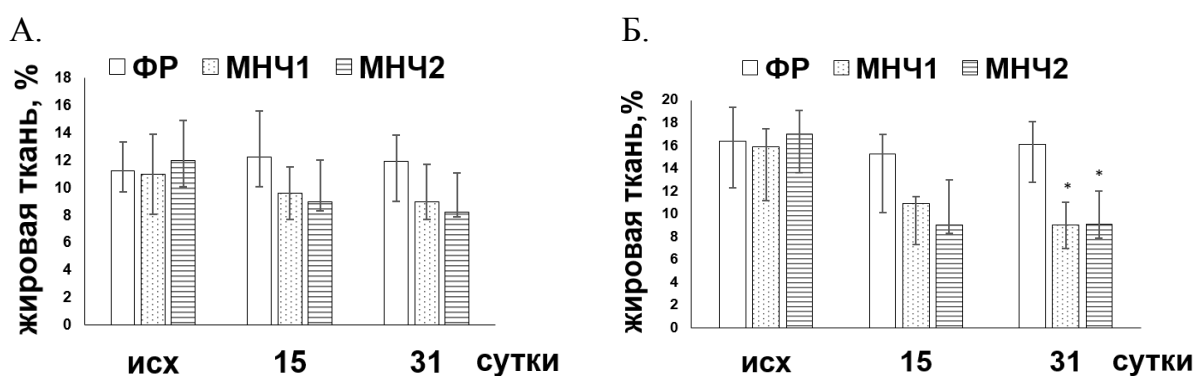


Рисунок 12 – Количество жировой ткани (% от массы тела) у крыс после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

Примечание: А. Самцы; Б. Самки. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Гематологические показатели животных всех групп в течение 31-дневного эксперимента не отличались от контрольных значений. Полученные результаты анализов крови и мочи крыс после однократного внутривенного введения МНЧ (таблица 3) свидетельствуют о наличии нефротоксического влияния МНЧ1 и наличии нефро- и гепатотоксического эффекта у МНЧ2.

Таблица 3 - Выявленные изменения со стороны биохимических показателей крови и лабораторного анализа мочи при однократном внутривенном введении немодифицированных магнитных наночастиц крысам

	Биохимический анализ крови	Анализ мочи
МНЧ1	Без изменений	Наличие лейкоцитов, кетоновых тел, белка
МНЧ2	↑ АЛТ, АСТ	Наличие белка, билирубина, кетоновых тел

Примечание: МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. АСТ- аспаратаминотрансфераза; АЛТ – аланинаминотрансфераза.

При попадании наночастиц в кровоток они могут взаимодействовать с ключевыми компонентами системы свертывания (тромбоциты, факторы свертывания) и оказывать про- и антикоагулянтные эффекты (М.Т. Zhu. et al., 2008; А.Н. Plinskaya. et al., 2013; Н. Sun. et al., 2018). 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. На 15 сутки после введения МНЧ2 наблюдалось повышение АЧТВ. На 31 сутки после введения всех видов МНЧ отмечалось снижение показателя тромбинового времени, увеличение АЧТВ (рисунок 13А-Г).

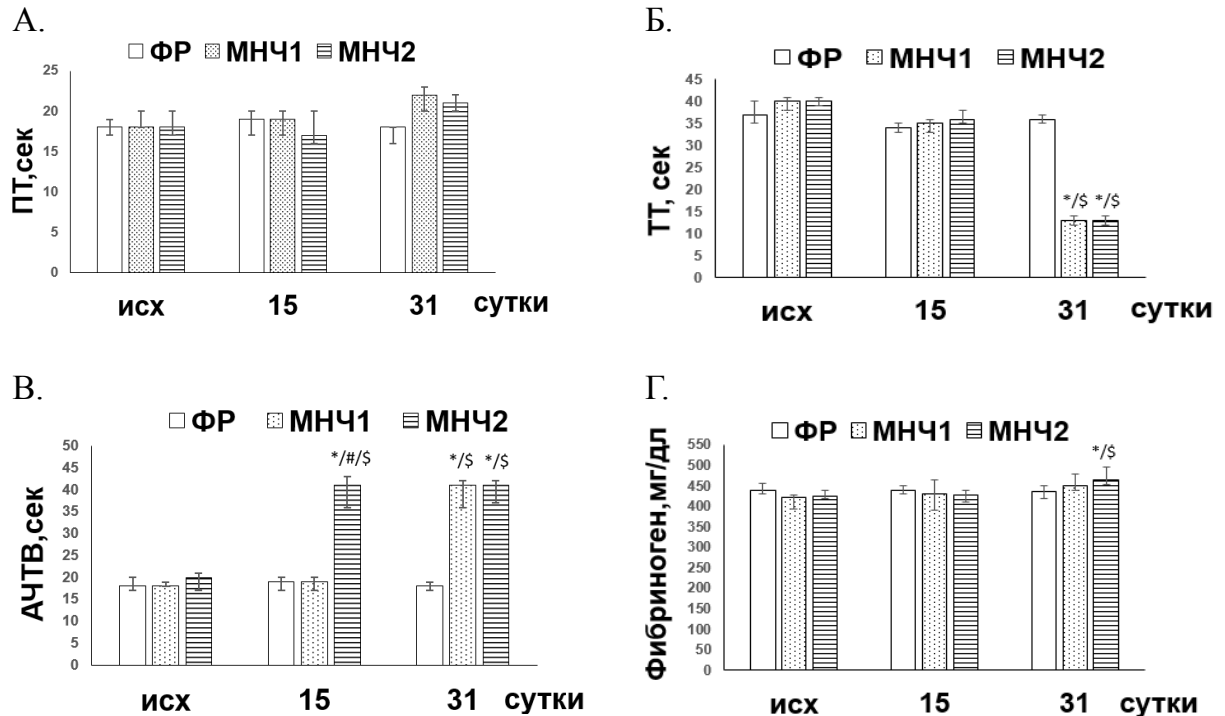


Рисунок 13 – Плазменные показатели гемостаза крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

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.

Отсутствие изменений ПТ у крыс 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 снижение коагуляционного потенциала. Можно предполагать, что вероятный дефицит плазменных факторов обусловлен гепатотоксическим действием наночастиц (которое более выражено у МНЧ2). Снижение у крыс ТТ также свидетельствует о гипокоагуляционных сдвигах, обусловленных дисбалансом анти- и прокоагулянтов, реализующих конечный этап свертывания крови, и/или токсическим поражением печени в условиях воздействия МНЧ.

На 15 сутки после однократного внутривенного введения крысам МНЧ1 и МНЧ2 наблюдалось повышение уровней провоспалительных цитокинов -

интерлейкина-1 β (IL-1 β) и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) (рисунок 14А, Б), что можно рассматривать как проявление воспалительной реакции в ответ на присутствие в организме МНЧ. К окончанию эксперимента данные показатели возвращались к исходным значениям.

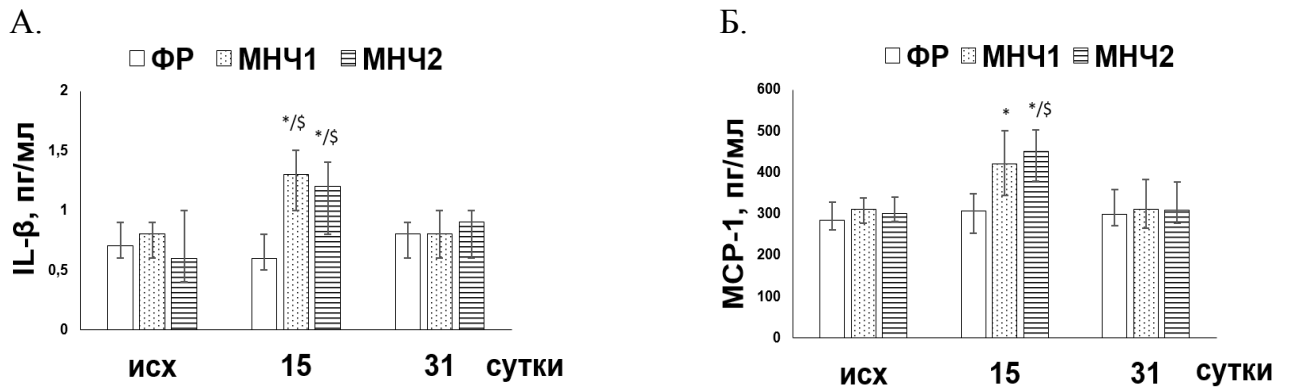


Рисунок 14 - Содержание интерлейкина-1 β и моноцитарного хемотаксического фактора-1 в плазме крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после однократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц
Примечание: ФР – физиологический раствор; МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. А. IL-1 β ; Б. MCP-1. *P < 0,05 по сравнению с контролем; §P < 0,05 по сравнению с исходным значением.

На фоне введения самцам МНЧ2, но не МНЧ1, массовый коэффициент печени оказался значимо ниже такового в группе контроля. Также у части животных с введением МНЧ2 наблюдалось снижение массового коэффициента почек. Остальные массовые коэффициенты органов крыс опытных и контрольной групп не различались между собой.

Гистологическая картина печени крыс к 31 суткам после однократного введения МНЧ2 характеризовалась присутствием Перлс-позитивной макрофагальной инфильтрации печеночных балок и образованием в зонах печеночных триад гранулем из клеток Купфера (рисунок 15А,Б). При гистологическом исследовании остальных органов животных после однократного внутривенного введения МНЧ отклонений от нормы не обнаружено.

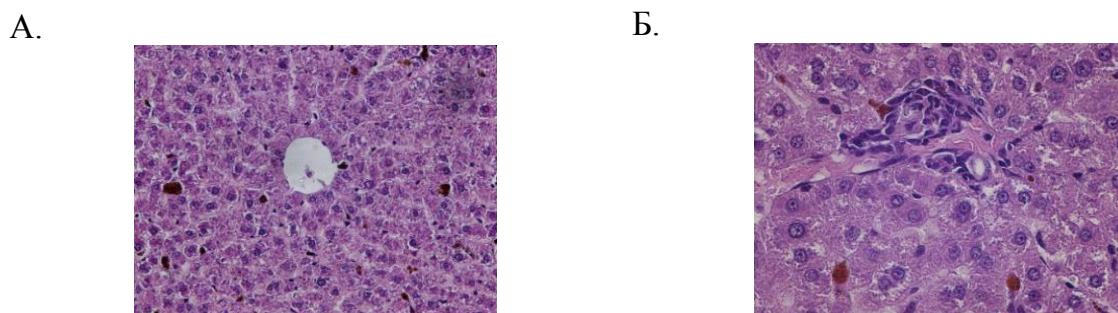


Рисунок 15 - Печень крыс после однократного внутривенного введения немодифицированных композитных наночастиц с оболочкой из диоксида кремния
Примечание: А. – Ув. х 200; Б. – Ув. х 400. Окраска по Перлсу с докрасиванием гематоксилином и эозином.

Таким образом, однократное внутривенное введение крысам МНЧ1 и 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, проводимом по описанной выше схеме). МНЧ вводили ежедневно в течение 7 дней. Дискретные точки соответствовали 15 и 31 суткам после последнего введения МНЧ.

Все животные после многократного введения МНЧ2 в дозе 30,0 мг/кг погибли в первые трое суток эксперимента (после третьего введения). При введении меньшей дозы МНЧ2 (10,0 мг/кг) выживаемость животных составила 100%. В группах с многократным введением МНЧ1 в дозах 30,0 мг/кг и 60,0 мг/кг гибели животных не наблюдалось. В связи с этим, на данном этапе исследования производили сравнительное исследование системных эффектов многократного введения МНЧ1 в дозах 30,0, 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг.

На фоне увеличивающегося во всех группах животных потребления корма и воды к 31 суткам у крыс с введением МНЧ1 в дозе 60,0 мг/кг наблюдалось приостановление нарастания массы тела (рисунок 16А, Б).

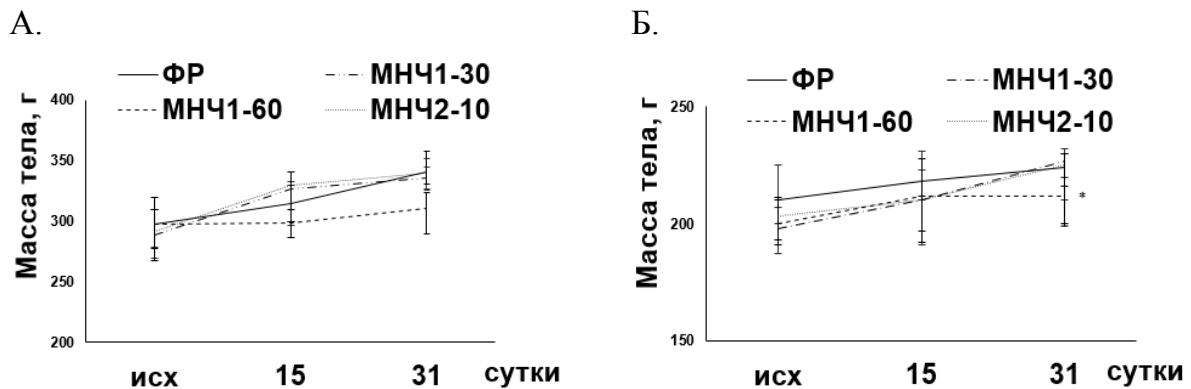


Рисунок 16 - Динамика массы тела экспериментальных животных после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

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

В ходе эксперимента у крыс с введением МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг наблюдалось снижение процента жировой ткани (рисунок 17А,Б), при этом общее количество воды в организме не отличалось от контроля.

При введении МНЧ1 в дозе 30,0 мг/кг изменений со стороны биохимически показателей крови и мочи не наблюдалось (таблица 4). При многократном введении крысам большей дозы МНЧ1 (60,0 мг/кг) и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг наблюдались нефротоксические и гепатотоксические эффекты наночастиц, при этом МНЧ оказывали более выраженное воздействие по сравнению с МНЧ1.

В ходе эксперимента гематологические показатели в группах крыс с введением МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг были близки по значениям к показателям контрольных групп. В то же время на фоне введения МНЧ2 в ходе эксперимента у крыс наблюдалось повышение уровня лейкоцитов с увеличением процента гранулоцитов и моноцитов, что может отражать наличие воспалительного процесса.

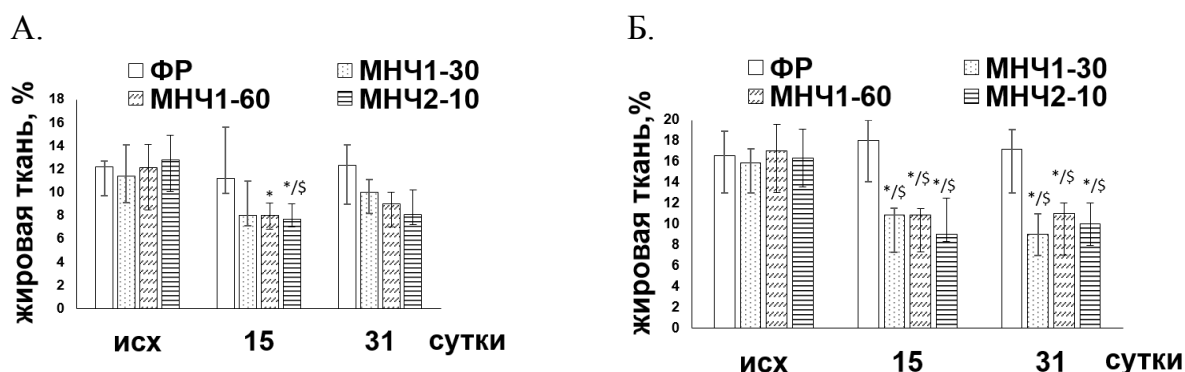


Рисунок 17 – Количество жировой ткани (% от массы тела) у крыс после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

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

Таблица 4 - Выявленные изменения со стороны биохимических показателей крови и мочи при многократном внутривенном введении немодифицированных магнитных наночастиц крысам

		Биохимический анализ крови	Анализ мочи
МНЧ1	30,0 мг/кг	Без изменений	Без изменений
	60,0 мг/кг	↑ АСТ	Наличие билирубина, уробилиногена, белка, эритроцитов
МНЧ2	10,0 мг/кг	↑ АЛТ, АСТ, билирубина	Наличие билирубина, уробилиногена, кетоновых тел

Примечание: МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. АСТ- аспаратаминотрансфераза; АЛТ – аланинаминотрансфераза.

Количество тромбоцитов в крови крыс всех исследуемых групп не различалось. На 15 сутки после последнего введения МНЧ2 наблюдалось повышение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), сохраняющееся к 31 суткам эксперимента (*рисунок 18А-Г*), что может быть связано с гепатотоксическим действием МНЧ2. В условиях многократного воздействия МНЧ1 во всех используемых дозах показатели гемостаза не отличались от контроля.

На 15 сутки после последнего введения МНЧ1 в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг и МНЧ2 в дозе 10,0 мг/кг у крыс наблюдалось повышение уровней провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (IL-1 β) и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) в плазме крови (*рисунок 19А,Б*), что может отражать воспалительный ответ на введение МНЧ. К окончанию эксперимента

данные показатели возвращались к исходным значениям. На фоне многократного введения МНЧ1 и МНЧ2 во всех используемых дозах изменений массовых коэффициентов органов крыс не наблюдалось.

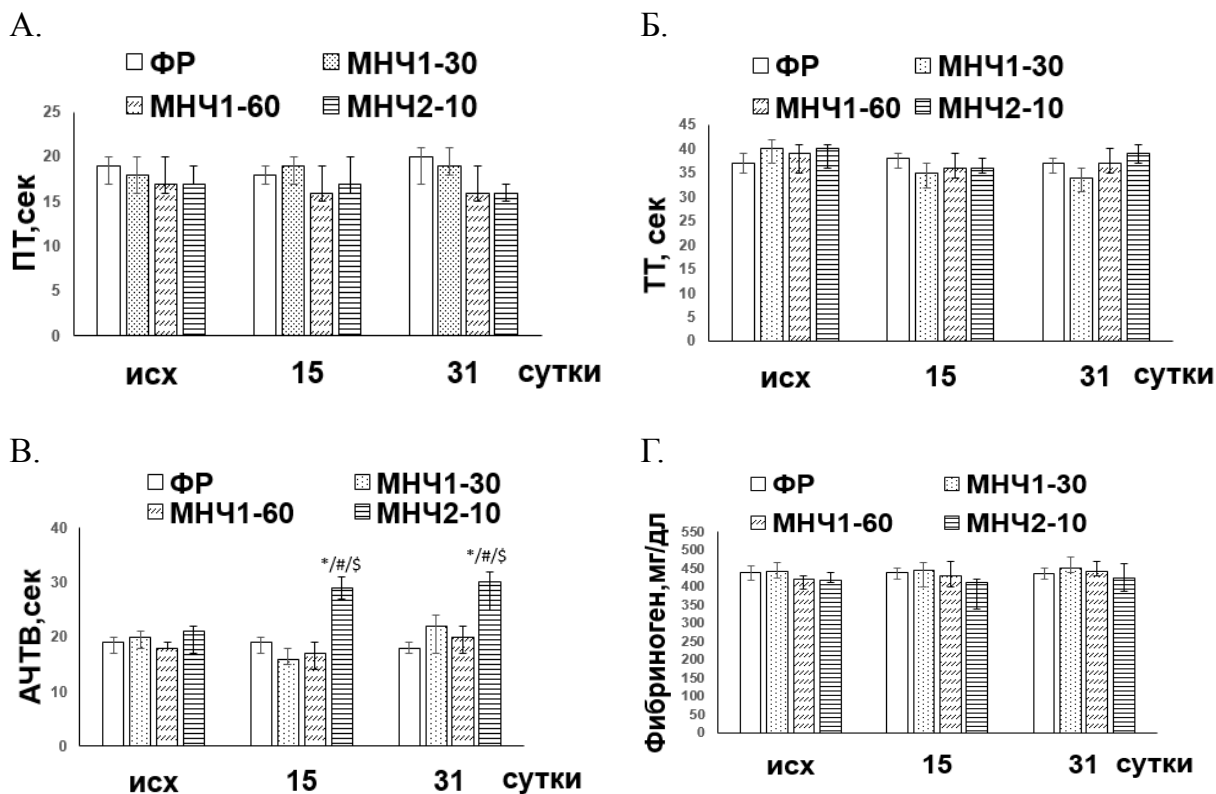


Рисунок 18 - Плазменные показатели гемостаза крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

Примечание: ФР – физиологический раствор; МНЧ1-30 и МНЧ1-60 – наночастицы магнетита в дозах 30,0 и 60,0 мг/кг, соответственно; МНЧ2-10 – 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 и МНЧ1-60 на аналогичном этапе эксперимента.

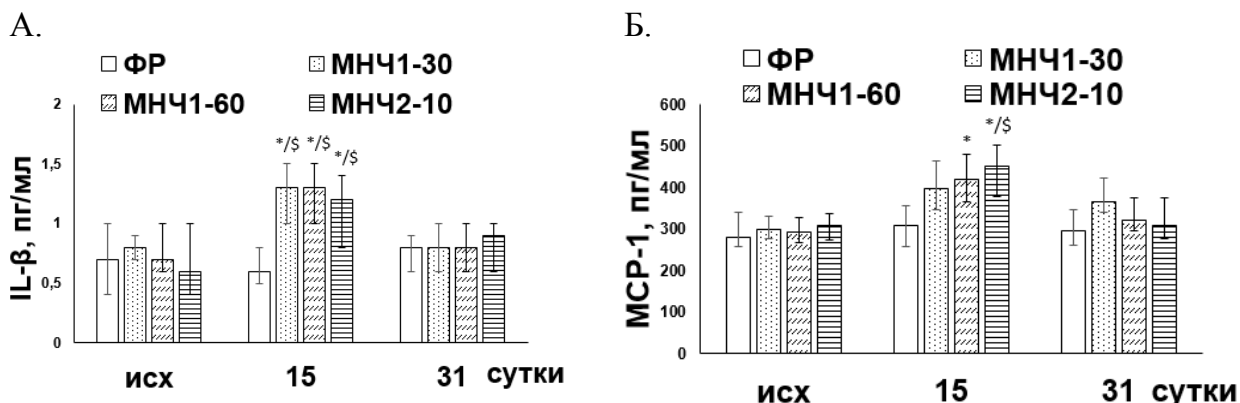


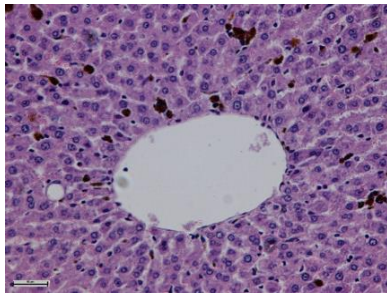
Рисунок 19 - Содержание интерлейкина-1β и моноцитарного хемотаксического фактора-1 в плазме крови самцов крыс на различных этапах эксперимента после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

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

Гистологический анализ органов, полученных от животных с введением обоих видов МНЧ во всех исследованных дозах, показал, что структура почек, сердца и головного мозга животных всех исследуемых групп не отличалась от контроля. Характерным для всех групп являлось присутствие в селезенке Перлс-позитивных макрофагов, что являлось свидетельством фиксации ими введенного железа.

В образцах печени крыс групп МНЧ1-30 и МНЧ1-60 наблюдалась макрофагальная инфильтрация клетками Купфера в зоне печеночных балок и триад (рисунков 20А,Б). Перлс-положительные клетки были наиболее представлены в группе МНЧ1-60. Для образцов печени группы МНЧ2 было характерно формирование гранулем из клеток Купфера.

А.



Б.

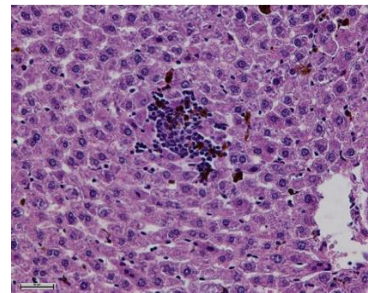


Рисунок 20 – Печень крыс после многократного внутривенного введения немодифицированных магнитных наночастиц

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

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.

При разработке наночастиц как средства магнитоуправляемой доставки лекарств необходимо учитывать возможность изменения под действием магнитного поля их биологических эффектов, а также их способности к агрегации. С учетом магнитных свойств исследуемых видов наночастиц можно ожидать снижения при воздействии магнитным полем их агрегативной устойчивости, что приводит к образованию агрегатов, механической закупорке сосудов и, как следствие, к нарушениям центральной и органной гемодинамики. В связи с этим было исследовано влияние внутривенного введения МНЧ на параметры гемодинамики на системном и органном уровнях при воздействии магнитным полем.

Гемодинамические параметры и показатели микроциркуляции в условиях *in vivo* и *ex vivo* при наличии 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 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).

При внутривенном введении МНЧ1 и МНЧ2 в условиях воздействия

магнитным полем параметры САД и ЧСС оставались на уровне контрольных значений. При введении МНЧ1 не наблюдалось значимых изменений со стороны органной перфузии, тогда как при введении МНЧ2 в ходе эксперимента наблюдалась тенденция к незначительному снижению микроциркуляции в миокарде, что, предположительно, обусловлено образованием под воздействием магнитного поля небольших конгломератов МНЧ, ориентированных вдоль силовых линий магнитного поля (Y.V. Bogachev. et al., 2014), и являющихся неустойчивыми во времени, на что указывает временный характер изменения микроциркуляции. Изменений микроциркуляции в печени, селезенке и почках при введении МНЧ в присутствии магнитного поля, локализованного в области сердца, обнаружено не было, что, вероятно, обусловлено преимущественным накоплением МНЧ в миокарде.

С учетом выявленных изменений микроциркуляции при воздействии магнитного поля в условиях введения МНЧ, было принято решение о проведении дополнительного исследования с оценкой параметров гемодинамики в условиях *ex vivo*.

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 МНЧ1 или МНЧ2. На момент окончания адаптации, на момент окончания введения МНЧ и через 10 минут после окончания введения оценивали параметры сократительной активности сердец: систолическое давление (СД, мм рт. ст.), конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.), давление, развиваемое левым желудочком (разница между систолическим и диастолическим давлениями, ДРЛЖ, мм рт. ст.), ЧСС (уд/мин). 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 такового (К-БМ) сократительная активность миокарда не изменялась в динамике всего эксперимента.

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 (*таблица 5*), проявляющимся в виде снижения КП и повышения КДД. При этом не наблюдалось статистически значимых различий в накоплении МНЧ в ткани сердца независимо от наличия или отсутствия магнитного поля (*рисунок 21*).

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 КП, отражающего количество перфузируемой жидкости, проходящей через коронарные сосуды изолированного сердца в единицу времени (*таблица 5*), что способствовало снижению сократительной активности миокарда.

Таблица 5 - Изменение сократительной активности изолированных сердец при интракоронарном введении немодифицированных магнитных наночастиц при отсутствии и наличии внешнего магнитного поля

	Условия эксперимента	Изменения параметров сократительной активности	Изменения коронарного протока
МНЧ1	Отсутствие магнитного поля	Без изменений	Без изменений
	Наличие магнитного поля	Повышение КДД	↓
МНЧ2	Отсутствие магнитного поля	Без изменений	↓
	Наличие магнитного поля	Повышение КДД	↓

Примечание: МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. Направление стрелок показывает снижение регистрируемого показателя.

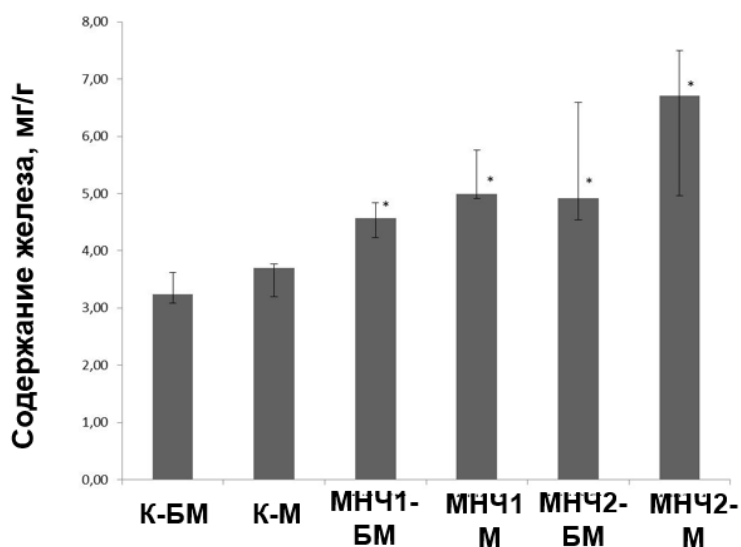


Рисунок 21 - Содержание железа в изолированных сердцах крыс после введения немодифицированных магнитных наночастиц в условиях наличия внешнего магнитного поля (по отношению к сухой массе органа)

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.

В основе снижения сократительной функции миокарда при воздействии МНЧ могут лежать также иные механизмы, не связанные с образованием агрегатов наночастиц (например, кальцийзависимые реакции (G. Oberdörster et al., 2005).

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.

Суммируя данные о влиянии МНЧ, имеющих различный качественный состав, на физиологические параметры (таблица 6), можно сделать вывод о меньшей степени нарушения физиологических функций в условиях воздействия МНЧ1.

Таблица 6 - Выявленные патофизиологические эффекты немодифицированных магнитных наночастиц

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 и нефротоксическое действие при одно- многократном введении	+	++
Гипокоагуляционный эффект	+ при однократном введении	+ при одно-и многократном введении

Примечание: МНЧ1 – наночастицы магнетита; МНЧ2 – композитные наночастицы с оболочкой из диоксида кремния. Количество + отражает выраженность эффекта.

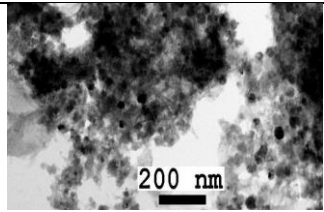
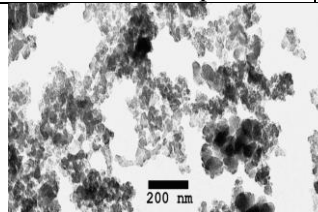
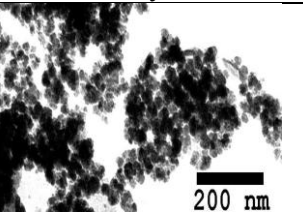
В связи с этим, в дальнейших сериях экспериментов с модификацией поверхности наночастиц посредством нанесения оболочек были использованы наночастицы магнетита (МНЧ1).

Нанесение оболочек на поверхность наночастиц является широко используемым подходом, применяемым с целью улучшения физико-химических свойств наночастиц, предотвращения их агломерации и окисления, повышения их биосовместимости (С. Barrera. et al., 2009; Г.Ю. Васюков и др., 2013; С.П. Туранская и др., 2013), а также для присоединения фармакологических агентов к их поверхности или инкорпорирования таковых в состав самой оболочки (А.К. Gupta. et al., 2005; А.К. Johnson. et al., 2008; J. Han. et al., 2019). Выбор оболочек основывался на относительной изученности данных полимеров, их биосовместимости и способности к биodeградации, позволяющих использовать их в медицинских целях.

Физико-химические свойства наночастиц магнетита с различными оболочками

Основные физико-химические характеристики образцов МНЧ1, покрытых различными оболочками, представлены в *таблице 7*.

Таблица 7 - Характеристики покрытых различными оболочками наночастиц магнетита

Характеристика /образец	Наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида	Наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида	Наночастицы альбумина с оболочкой из альбумина
ПЭМ-изображение			
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

Морфофункциональное состояние сосудов в условиях однократного внутривенного введения наночастиц магнетита с различными оболочками

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.

Сократительная активность артериальных сосудов на фоне введения всех видов МНЧ не отличалась от таковой в контрольной группе (рисунок 22, таблица 8). Снижение релаксации наблюдалось только в условиях введения МНЧ+полисахарид при концентрациях АХ 1,3-3 мкМ. С увеличением концентрации АХ до 3-10 мкМ способность к расслаблению была близка к уровню в контрольной группе.

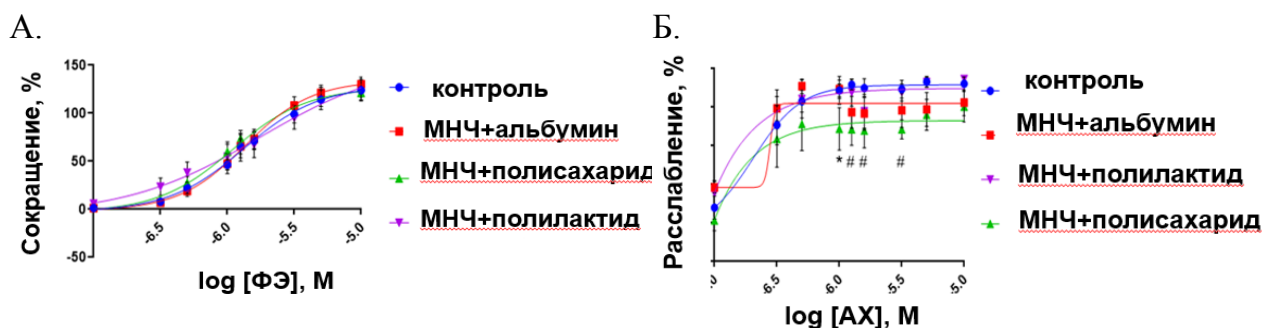


Рисунок 22 - Кумулятивная кривая «концентрация-ответ»

Примечание: МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактоида; 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.

Таблица 8 - Значения логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа log EC₅₀ и максимальной величины ответа E_{max} в группах с введением модифицированных оболочками магнитных наночастиц

	ФЭ		АХ	
	log, EC ₅₀ , M	E _{max} , %	log, EC ₅₀ , M	E _{max} , %
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 полилактоида; 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.

Наблюдаемое снижение релаксационной функции сосудов на фоне введения МНЧ+полисахарид, по всей вероятности, не связано со снижением биодоступности NO, о чем свидетельствует неизменный (относительно контроля и других видов наночастиц) уровень плазменного NO. Возможность активной интернализации

наночастиц в эндотелий как механизма влияния на расслабляющую функцию сосудов также не подтвердилась 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 ацетилхолина (АХ).

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.

Исследование патофизиологических эффектов, модифицированных оболочками наночастиц магнетита при их однократном внутривенном введении крысам

Исследование патофизиологических эффектов 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, 5, 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.

Средняя доза наночастиц, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы LD50, составила для: МНЧ+полилактид - 4,6 мл/кг, МНЧ+полисахарид - 7,9 мл/кг и МНЧ+альбумин более 10 мл/кг. Для всех исследованных МНЧ не было отмечено зависимости между количеством животных с клиническими признаками нарушения здоровья и введенной дозой.

Гематологические показатели крыс через 9 дней после однократного внутривенного введения модифицированных МНЧ в используемых дозах не различались между собой и не отличались от контроля.

При проведении плановой некропсии основные изменения были выявлены в печени и легких, на основании чего был проведен гистологический анализ данных органов. Для гистологического анализа использовались препараты тканей, полученных от крыс после однократного внутривенного введения МНЧ всех видов в дозе 100 мг/кг, поскольку животные соответствующих групп получили максимальную дозу МНЧ и дожили до некропсии в количестве, достаточном для сравнения патоморфологических изменений, обусловленных каждым из исследуемых МНЧ. Проведенный гистологический анализ позволил ранжировать исследуемые виды МНЧ по степени гепатотоксичности (убывания выраженности реактивных изменений в печени): МНЧ+полисахарид > МНЧ+полилактид >> МНЧ+альбумин, а также по степени пульмонотоксичности (убывания выраженности гранулемообразования): МНЧ+альбумин >> МНЧ+полилактид > МНЧ+полисахарид. Полученные различия в органотоксичности МНЧ, вероятно, связаны с различиями в качественном составе их оболочек, обуславливающими их тропность к конкретным органам.

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.

Общепризнанным механизмом токсичности наночастиц является интенсификация процессов свободнорадикального окисления (A. Manke et al., 2013; M.O. Ansari. et al., 2019). Качественный состав оболочки является одним из ключевых факторов, определяющим биологические эффекты наночастиц и их токсикологический профиль (U. Patil. et al., 2015; S. Mandal. et al., 2017; Q. Feng. et al., 2018). В ряде работ показана дозозависимая токсичность наночастиц на основе оксида железа, опосредованная избыточной генерацией АФК (T.R. Pisanic. et al., 2007; U.S. Gaharwar. et al., 2017; U.A. Reddy et al., 2017). Покрытие наночастиц различными оболочками широко используется для повышения биосовместимости наночастиц, в том числе за счет обеспечения снижения их реакционной способности (C. Barrera et al., 2009; С.П. Туранская и др., 2013).

Влияние покрытых оболочками МНЧ на генерацию активных форм кислорода при инкубации с 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 активных форм кислорода (АФК) осуществляли методом люминолзависимой ХЛ через 3 часа инкубации наночастиц с кровью.

Через 3 часа инкубации МНЧ+полисахарид в дозах 0,2, 1,0 и 2,0 мг/мл наблюдалось увеличение параметров ХЛ (таблица 9). При этом на фоне воздействия МНЧ+альбумин изменения параметров ХЛ не наблюдалось. МНЧ+полилактид во всех используемых дозах снижали спонтанную ХЛ ($4,23 \pm 0,46$ о.е.).

Таблица 9 - Влияние МНЧ+полисахарид на спонтанную хемилюминесценцию крови через 3 часа инкубации (интегральные значения интенсивности ХЛ (S, измеряемые в относительных единицах, о.е.), характеризующие суммарный синтез АФК за 10 мин)

Вид МНЧ	Концентрация МНЧ, мг/мл	S, о.е.
Контроль	-	$12,7 \pm 3,3$
МНЧ+полисахарид	0,2	$136,5 \pm 56,7^*$
МНЧ+полисахарид	1,0	$94,8 \pm 5,1^*$
МНЧ+полисахарид	2,0	$52,3 \pm 10,0^*$

Примечание: МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; *P<0,05 по сравнению с контролем

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. (G.Y. Liou. et al., 2010; J.N. Moloney. et al., 2018). Также показано, что изменение окислительно-восстановительного баланса в миокарде коррелирует со степенью его некроза после инфаркта, а также с выраженностью реперфузионного повреждения (D. Moris et al. 2017). 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 оценке их влияния на уровень АФК, вырабатываемых клетками, находящимися в условиях окислительного стресса.

Влияние наночастиц магнетита, 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 хемилюминесценции (ХЛ) добавляли опсонизированный зимозан, являющийся индуктором генерации клетками активных форм кислорода (АФК), с дальнейшей регистрацией показателей индуцированной ХЛ в течение 30 мин.

Добавление зимозана резко усиливало генерацию АФК, оцениваемую по уровню ХЛ (таблица 10). 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 10).

Таблица 10 - Влияние наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида на индуцированную хемилюминесценцию (S, измеряемые в относительных единицах, о.е.), через 3 часа инкубации с кровью человека

Вид МНЧ	Концентрация МНЧ, мг/мл	S, о.е.
Контроль без индукции ХЛ	-	13,3±4,4
Контроль с индукцией ХЛ		16096±6165
МНЧ+полилактид	0,2	3364±766*
МНЧ+полилактид	1,0	2258±602*
МНЧ+полилактид	2,0	1695±305*

Примечание: МНЧ+полилактид – наночастицы магнетита с оболочкой из полилактида. *P<0,0001 по сравнению с контролем.

В основе снижения индуцированной ХЛ в условиях воздействия МНЧ+полилактид могут лежать различные механизмы. Можно предполагать способность данного вида наночастиц связывать свободные радикалы либо стимулировать наночастицами антиоксидантных систем, а также сочетание данных механизмов.

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.

По суммации оказываемых эффектов наибольшей биосовместимостью обладают МНЧ+полилактид и МНЧ+альбумин (таблица 11).

Таблица 11 - Выявленные эффекты модифицированных различными оболочками наночастиц магнетита

Эффект	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 полилактоида; МНЧ+полисахарид – наночастицы магнетита с оболочкой из полисахарида; МНЧ+альбумин – наночастицы магнетита с оболочкой из альбумина.

Для исследования 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.

Экспериментальное подтверждение возможности использования наночастиц магнетита для их магнитоуправляемой доставки (ex vivo, in vivo)

Эксперимент ex vivo проводили на гидродинамическом стенде, который состоял из двух внутренних камер, заполненных 120 мл раствора Кребса-Хензеляйта (К-Х), помещаемых во внешнюю камеру, выполняющую роль водяной бани (рисунок 23).

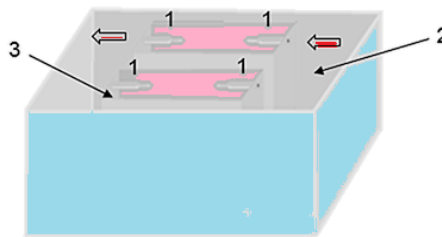


Рисунок 23 - Камера, в которую помещаются сосуды

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

На концах канюль внутренней камеры герметично закрепляли парные изолированные сосуды 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 объёме 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 для оценки концентрации МНЧ. Контролем являлся раствор К-Х, забранный из внутренней камеры, в которой воздействие магнитом не осуществлялось.

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 12). При этом в контрольной группе накопления МНЧ во внутренней камере не наблюдалось.

Таблица 12 – Количество прошедших через стенку сосуда крысы наночастиц магнетита под воздействием внешнего магнитного поля при введении в сосуд 0,1 мг наночастиц

Камера с магнитом	0,033±0,004 мг
Камера без магнита	0

Таким образом, в стендовых условиях использование постоянного магнита способствует прохождению МНЧ через стенку изолированного сосуда крысы, что подтверждает возможность магнитоуправляемой доставки лекарств с помощью данного вида наночастиц к поврежденным тканям.

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. Характеристики магнитных наночастиц оксида железа (способность к локальному нагреву, возможность их визуализации) определяют данный вид наночастиц как наиболее перспективных для разработки многофункциональных (сочетающих возможность одновременного сочетания их вышеуказанных свойств) систем адресной доставки цитостатических препаратов к опухолям. 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) отмечалось преимущественное накопление ИЦЗ-МНЧ в печени, увеличивающееся со временем (*рисунок 24А,Б, таблица 13*). 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 у животных группы ИЦЗ-МНЧ+опухоль+М не изменялась (*рисунок 24Б*).

Таблица 13 – Динамика интенсивности свечения в печени и опухоли после внутривенного введения мышам МНЧ+полилактид, $\frac{p/s}{\mu W / cm^2}$

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	$1,3 \pm 0,4 \times 10^9$ [@]	$2,9 \pm 0,2 \times 10^8$	$7,0 \pm 0,5 \times 10^8$ [#]	$5,2 \pm 0,7 \times 10^8$ [#]

Примечание: [@]P<0,05 по сравнению с 1-ой минутой после введения; [#]P<0,05 по сравнению со значениями эксперимента без имплантации магнита.

На *рисунке 24В* показана интенсивность флуоресценции в опухоли через 15 минут после введения ИЦЗ-МНЧ. В области воздействия магнитного поля наблюдалось существенное накопление ИЦЗ-МНЧ. 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.

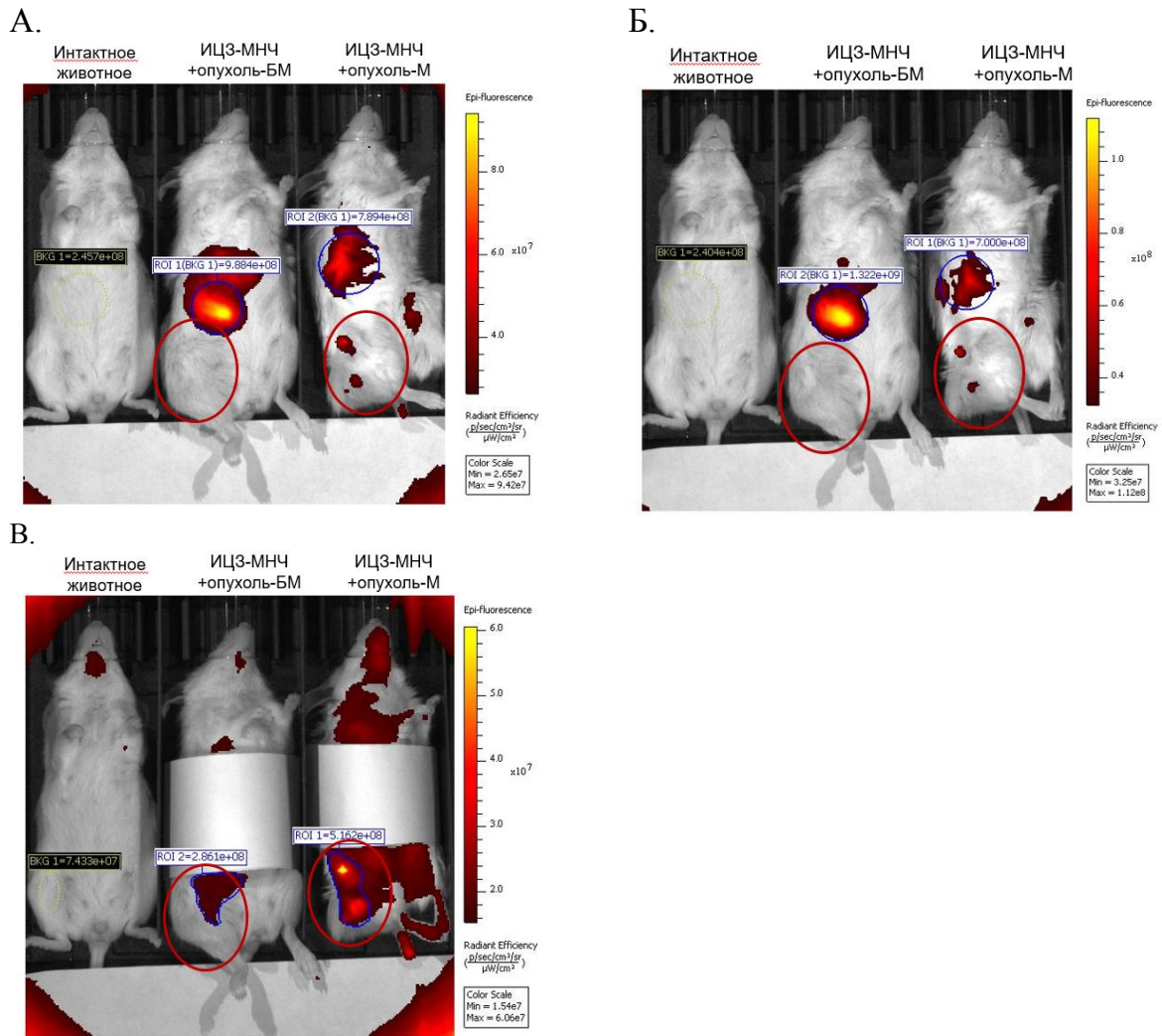
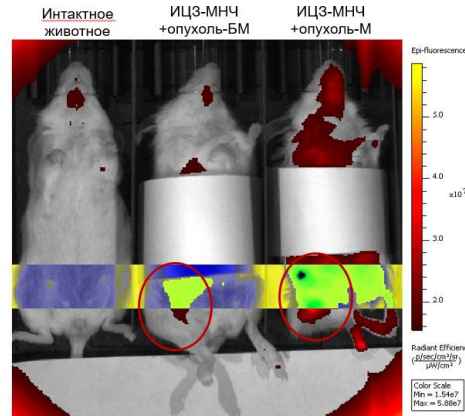


Рисунок 24 – Динамика флуоресценции наночастиц с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым при их однократном внутривенном введении мышам с опухолевым процессом (участок локализации опухоли выделен окружностью)

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. Интенсивность флуоресценции: А. печени через одну минуту после введения; Б. печени через 15 минут после введения; В. опухоли через 15 минут после введения (для исключения засветки флуоресценцией печени сигнала вторичного излучения от опухоли область печени была экранирована белой бумагой).

Для наглядности этого процесса был снят профиль средней световой отдачи в горизонтальном сечении (*рисунок 25А, 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.

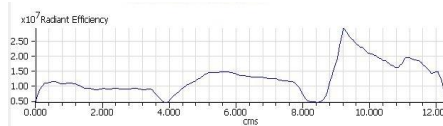


Рисунок 25 - Интенсивность флуоресценции в опухоли через 15 минут после введения мышам наночастиц магнетита с оболочкой из полилактида с включенным в состав оболочки индоцианином зеленым

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.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus:

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. 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. Влияние наночастиц магнетита и коллоидных частиц FemOn-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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. 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).

14. 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).

15. 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).

16. 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).

17. 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.B. Malashicheva, D.V. Korolev, A.N. Gorshkov, K.G. Gareev, M.V. Afonin, M.M. Galagudza. // International Journal of Nanomedicine. -2017. - Т. 12. - P. 593-603. doi: [10.2147/IJN.S122580](https://doi.org/10.2147/IJN.S122580) (Scopus).

Патент

18. 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 Cl, 15.07.2019. Заявка № 2018132156 от 07.09.2018.

Публикации в других изданиях

19. Глава: Магнитоуправляемая доставка цитостатиков / Я.Г. Торопова, И.А. Зелинская, Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза // Трансляционная медицина. Санкт-Петербург, 2020. - С. 137-154.

20. Глава: Магнитоуправляемая доставка лекарств в миокард / Я.Г. Торопова, Д.В. Королёв, 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.

21. 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. Королёв, Я.Г. Торопова // Трансляционная медицина: Алмазовский молодежный медицинский форум-2020 (Санкт-Петербург, 21 - 23 мая 2020 г). Санкт-Петербург, 2020. С. 344.

22. 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.

23. Синтез наночастиц магнетита с полисахаридной оболочкой для магнитоуправляемой доставки лекарств / К.Г. Гареев, Д.В. Королёв, 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.

24. 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.

25. 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.

26. Хемиллюминесцентный 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.

27. 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.

28. 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.

29. 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.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД	-артериальное давление
АФК	-активные формы кислорода
АХ	-ацетилхолин
АЛТ	-аланинаминотрансфераза
АСТ	-аспартатаминотрансфераза
АЧТВ	-активированное частичное тромбопластиновое время
ДРЛЖ	-давление, развиваемое левым желудочком
ИАЭ	-индекс агрегации эритроцитов
ИФА	-иммуноферментный анализ
КГ	-коэффициент гемолиза
КДД	-конечное диастолическое давление
КП	-коронарный проток
МНЧ	-магнитные наночастицы оксида железа
ОСП	объемная скорость перфузии
ПТ	-протромбиновое время
ПЭМ	-просвечивающая электронная микроскопия
ПД	-перфузионное давление
САД	-среднее артериальное давление
СД	-систолическое давление
ТТ	-тромбиновое время
ФР	-физиологический раствор
ФЭ	-фенилэфрин
ХЛ	-хемиллюминесценция
ЧСС	-частота сердечных сокращений
ЕС50	- концентрация, обеспечивающая 50% максимального ответа
E_{max}	- величина ответа при максимальной концентрации агониста
HUVEC	-эндотелиальные клетки человека
I_{max}	- максимальная интенсивность свечения за промежуток времени
IL-1β	-интерлейкин 1-бета
MCP-1	- моноцитарный хемотаксический фактор
NO	-оксид азота
S	-полная светосумма свечения за промежуток времени
X_{max}	-время достижения максимальной интенсивности свечения

ТОРОПОВА
Яна Геннадьевна

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук