Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет

имени Д.И. Менделеева»

На правах рукописи

A

Абакумов Максим Артемович

«Магнитные наночастицы для биомедицины: синтез, характеристика и применение»

2.6.6. «Нанотехнологии и наноматериалы»

1.5.6. «Биотехнология»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Москва -2025

Работа выполнена в ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Научные консультанты:	Доктор химических наук, профессор РАН Мажуга Александр Георгиевич				
	Доктор медицинских наук, профессор, академик РАН				
	Чехонин Владимир Павлович				
Официальные оппоненты:	Кыдралиева Камиля Асылбековна д.х.н., доцент, проф. кафедры 903 «Перспективные материалы и технологии аэрокосмического назначения» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»				
	Деев Сергей Михайлович Д.б.н., проф., академик РАН, главный научный сотрудник лаборатории биомолекулярных технологий для онкотераностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук				
·	Макаров Вадим Альбертович Д.ф н., Заведующий лабораторией биомедицинской химии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»				
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное				

образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет наук о материалах

Защита состоится «16» сентября 2025 года в 10:00 на заседании диссертационного совета РХТУ.2.6.03 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева и на официальном сайте университета http://diss.muctr.ru

Автореферат разослан « » 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета

РХТУ.2.6.03., доцент, к.х.н.

they

Мурадова А.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В настоящее время магнитные наночастицы (МНЧ) используются в качестве контрастных агентов для MPT¹, при магнитной гипертермии (МГТ)², и сепарации клеток и молекул³, в качестве перспективных средств для магнитомеханического управления активностью ферментов и жизнеспособностью клеток⁴. МНЧ состоят из металлов, таких как Fe, Co, Ni, а также их простых и сложных оксидов. МНЧ, образованные чистыми металлами, крайне легко окисляются и их применение ограничено. Кроме того, среди вышеперечисленных металлов наиболее доступным и наименее токсичным является железо. Все это делает МНЧ, образованные простыми и сложными оксидами железа, наиболее перспективными для применения в биомедицине.

Степень разработанности темы

На момент начала работ (2012 год) уже было понятно, что МНЧ являются сложным объектом для исследования, так как их магнитные, функциональные свойства и потенциал биомедицинского применения обусловлены комбинацией большого числа разнообразных факторов, определяющихся методом синтеза (форма, размер, состав магнитного ядра, структура оболочки, гидродинамический размер, поверхностный заряд и т.п.). Это связано с тем, что, например, изменение размера ядра наночастицы влечет за собой изменение ee магнитных свойств, гидродинамического размера, удельной площади поверхности и т.п. Однако, помимо физико-химических свойств, данные изменения также затрагивают функциональные характеристики МНЧ, такие как Т1 и Т2 релаксивности, определяющие эффективность МНЧ в качестве контрастных средств, или тепловыделительную способность под действием ЭМ поля (SAR), определяющую эффективность МНЧ при проведении магнитной гипертермии опухолей. Для успешного применения МНЧ в биомедицинских приложениях критически важными являются такие параметры, как токсичность МНЧ, как на уровне взаимодействия с клетками, так и в масштабе всего организма, а также эффективность их доставки в целевой орган. В

¹ Kim E.H. et al. // J Magn Magn Mater. - 2005. - Vol. 289. - P. 328–330

² Espinosa A. et al. // ACS Nano. - 2016. - Vol. 10. - № 2. - P. 2436–2446.

³ Thomas J.A. et al. // Chemosensors. - 2020. - Vol. 8. - № 1.

⁴ Efremova M.V. et al. // ACS Nano. - 2018. - Vol. 12. - № 4. - P. 3190–3199.

связи с этим крайне актуальной становится задача изучения взаимосвязи морфология/состав-свойства-биологическая активность МНЧ для оценки эффективности и потенциала применения в качестве МР-контрастных агентов, средств доставки лекарств и в магнитной гипертермии. Решение данной задачи позволит определить оптимальные характеристики МНЧ для биомедицинских применений и сократить время между лабораторной разработкой метода получения НЧ и их внедрением в клиническую практику.

Цель работы: Установление взаимосвязи формы, размера, состава и связанных с ними физико-химических свойств МНЧ с потенциалом биомедицинского применения в качестве МР-контрастных агентов, средств доставки лекарств и в качестве лекарственных средств для магнитной гипертермии. Дизайн и разработка методов синтеза МНЧ на основе сложных оксидов для терапии и диагностики опухолей.

Задачи исследования:

 Разработать химические методы синтеза МНЧ на основе сложных оксидов железа и получение наночастиц заданной формы (сферы, кубы, стержни, кластеры), размера (5-40) нм и состава;

2) Исследовать морфологию, структуру и магнитные свойства (статические и динамические) синтезированных МНЧ;

3) Разработать методы функционализации поверхности МНЧ биосовместимыми покрытиями, позволяющие получать стабильные водные коллоидные растворы;

4) Исследовать влияние размера и формы МНЧ на токсичность в экспериментах *in vitro*;

5) Исследовать влияние размера и формы МНЧ на эффективность визуализации опухолей методом МРТ;

6) Исследовать возможность использования МНЧ для доставки противоопухолевых препаратов различной природы (доксорубицин, бактериохлорин *a*) для терапии опухолей;

7) Исследовать возможность применения МНЧ феррита кобальта для терапии опухолей методом магнитной гипертермии.

2

Научная новизна работы

Впервые проведено систематическое исследование взаимосвязи физикохимических и магнитных свойств МНЧ с потенциалом биомедицинского применения в качестве МР-контрастных агентов, средств доставки лекарств и в качестве лекарственных средств для магнитной гипертермии.

Разработаны препаративные методы получения МНЧ. Так, установлено, что метод термического разложения ацетилацетоната железа (III) в бензиловом спирте позволяет получать высококристалличные, монодисперсные, гидрофильные МНЧ сферической морфологии. Впервые обнаружено, что введение в реакционную смесь олеиновой кислоты и ее производных приводит к получению МНЧ кубической морфологии, циклических алифатических и ароматических карбоновых кислот – кластерной морфологии, а полиэтиленимина и дофамина – стержневидной морфологии. Показано, что путем замены ацетилацетоната железа (III) на ацетилацетонат кобальта (II) в стехиометрическом соотношении могут быть получены МНЧ феррита кобальта кубической морфологии.

Впервые экспериментально показано экспоненциальное увеличение намагниченности насыщения для кубических МНЧ при увеличении размера кристаллита, тогда как для кластерных МНЧ, увеличение намагниченности насыщения определяется размером всего кластера, а не его отдельного кристаллита. Показано, что зависимость параметров T2 релаксивности и SAR от размера МНЧ имеет нелинейный характер с локальными максимумами в диапазоне размеров МНЧ 10-20 нм.

Установлено, что МНЧ, функционализированные биосовместимыми полимерами, содержащими ПЭГ, не проявляют цитотоксического действия на клеточных культурах вне зависимости от своей формы.

Обнаружено, что биосовместимое покрытие на основе сывороточного альбумина и ПЭГ обеспечивает наиболее высокое накопление МНЧ в опухолях. Показано, что морфология МНЧ определяет их распределение после внутривенного введения. Так, среди анизотропных МНЧ кубические МНЧ обладают наибольшим потенциалом в качестве контрастного средства для диагностики опухолей методом MPT.

3

Установлено, что конъюгация МНЧ, покрытых сывороточным альбумином, функционализированным ПЭГ и загруженных доксорубицином, с антителами к фактору роста эндотелия сосудов позволяет повысить эффективность доставки МНЧ в опухоль и увеличить медиану выживаемости животных с аденокарциномой молочной железы 4T1.

Показано, что внутривенное введение МНЧ, покрытых сывороточным альбумином, функционализированным ПЭГ и загруженных фотосенсибилизатором бактериохлоринового ряда, позволяет определить время максимального накопления фотосенсибилизатора в опухоли путем МРТ, позволяющее обеспечить максимальное торможение роста опухоли после проведения фотодинамической терапии.

Среди многообразия исследованных МНЧ только наночастицы феррита кобальта сферической морфологии с размером 12±4 нм показывают эффективность в магнитной гипертермии опухолей. Так, на примере опухоли СТ26 показано, что магнитная гипертермия приводит к излечению животных в 100% случаев.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определены параметры химического синтеза магнитных наночастиц, позволяющие контролировать их форму, размер и состав. Полученные зависимости свойств магнитных наночастиц от их формы, размера и состава позволяют определить оптимальный тип МНЧ для применения в качестве контрастных средств для МРТ, доставки лекарств и терапии опухолей методом магнитной гипертермии. Разработан контрастный препарат для МРТ на основе сферических наночастиц магнетита, стабилизированных сывороточным альбумином и полиэтиленгликолем, продемонстрирована его эффективность и безопасность в диагностике опухолей. Полученные наночастицы позволяют проводить неинвазивный мониторинг накопления лекарственных препаратов в опухоли после внутривенного введения методом МРТ. Разработаны МНЧ на основе кобальтового феррита, показана их эффективность и безопасность в качестве агентов для магнитной гипертермии.

Методология и методы исследования

При проведении экспериментальных работ были использованы современные аналитические методы: рентгено-фазовый анализ, мёссбауэровская спектроскопия, вибрационная магнитометрия, просвечивающая электронная микроскопия, метод динамического рассеяния света. T2 релаксометрия, спектрофотометрия, ИК-спектроскопия, спектрофлуориметрия, атомно-эмиссионная спектроскопия, цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия, проточная определение цитотоксичности методом MTS и LDH теста, оптическая томография, магнитнорезонансная томография.

Достоверность и обоснованность защищаемых научных положений, выводов рекомендаций подтверждается достаточным объемом И И результатами экспериментальных исследований, использованием современного лабораторного, пилотного И аналитического оборудования И стандартизованных методик, обоснованным использованием методов математической статистики; расчетов удовлетворительной сходимостью результатов аналитических с экспериментальными данными.

Положения, выносимые на защиту

1) Морфология магнитных наночастиц определяется физикохимическими свойствами поверхностно-активных веществ, растворителей и металлсодержащих прекурсоров, их соотношениями, а также скоростью нагрева и конечной температурой реакционной смеси;

2) Т2 релаксивность и тепловыделительная способность магнитных наночастиц определяются размерами и формой магнитного ядра;

 Форма магнитных наночастиц определяет параметры их фармакокинетики после внутривенного введения;

4) Модификация поверхности магнитных наночастиц биосовместимыми покрытиями, содержащими полиэтиленгликоль, позволяет получать стабильные водные коллоидные растворы наночастиц, не проявляющие токсичности в целевом диапазоне концентраций в экспериментах, как на культуре клеток, так и при внутривенном введении;

5) Конъюгация магнитных наночастиц, несущих противоопухолевые препараты, с векторными лигандами позволяет повысить эффективность их доставки в орган-мишень и увеличить терапевтический эффект;

6) Иммобилизация фотосенсибилизаторов на поверхность магнитных наночастиц позволяет осуществить мониторинг накопления фотосенсибилизатора в опухолевом очаге методом MPT, а также определить наиболее благоприятное время для проведения фотодинамической терапии;

7) Использование в качестве магнитной фазы феррита кобальта увеличивает тепловыделительную способность частиц, что позволяет осуществить контролируемый нагрев опухолевой ткани после интратуморального введения при магнитной гипертермии опухолей;

Степень достоверности и апробации работы

Степень достоверности представленных количественных данных определяется инструментальной погрешностью использованного аналитического оборудования и статистической обработкой полученных результатов. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на всероссийских и международных научных конференциях, в числе которых: 11-я международная конференция «SpinS-2019» (Дуйсбург, Германия, 2019 г), Ш международная конференция «III International Baltic Conference on Magnetism 2019» (Калининград, Россия, 2019 г), 1-я международная школа-конференция «Сканирующая зондовая Россия, микроскопия для биологических систем» (Москва, 2019 г), III Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорадиология, лучевая диагностика и терапия» (Москва, Россия, 2020 г), Школаконференция для молодых ученых «Органическая фотоника и полифункциональные материалы 2020» (Москва, Россия, 2020 г), 1ый международный форум и летняя школа для молодых ученых «Magnetic nanohybrids for cancer therapy» (Тессалоники, Греция, 2021 г), IV Байкальский материаловедческий форум (Улан-Удэ, Россия, 2022 г), 4-я международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем» (Москва, Россия, 2022 г), 1-я международная конференция "Armenia's Perspectives in Current Oncology Theranostics" (APRICOT) (Ереван, Армения, 2023 г), Всероссийская Конференция с международным участием «Оптогенетика+2023» (Санкт-Петербург, Россия, 2023 г), 2-й Саммит разработчиков лекарственных препаратов (Сочи, Федеральная территория «Сириус», Россия, 2024 г), Х Всероссийская научная молодежная школа-конференция «ХИМИЯ, ФИЗИКА, БИОЛОГИЯ: ПУТИ ИНТЕГРАЦИИ» (Москва, Россия, 2024 г).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано более 40 печатных работ, в числе которых 27 статей, входящих в базы данных научного цитирования Scopus/Web of Science, 9 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций, 8 патентов на изобретение.

Связь работы с государственными программами

Результаты работы были получены в рамках грантов Министерства образования и науки РФ государственные контракты № 14. N08.11.0059, №14. N08.11.0079, соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0132, гранта РНФ №17-74-10169, гранта РФФИ № 16-33-60180, гранта Президента РФ МК6371.2016.7.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части, описывающей материалы, методики синтеза МНЧ, модификации и функционализации их поверхности, и методы их исследования *in vitro* и *in vivo*, выводов и списка литературы. Работа изложена на 260 страницах печатного текста, содержит 27 таблиц и 80 рисунков. Список литературы включает 401 источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертационное исследование, в соответствии с поставленными задачами, представляет ряд логически связанных этапов:

- Разработка методов синтеза МНЧ с контролируемыми формой размером и составом;
- 2) Исследование структуры и свойств полученных образцов МНЧ;
- Разработка методик функционализации МНЧ биосовместимыми покрытиями и исследование их стабильности;
- Исследование токсичности и функциональной активности МНЧ в экспериментах *in vitro*;

5) Исследование функциональной активности (в качестве МР-контрастных агентов, средств доставки лекарств и в качестве лекарственных средств для магнитной гипертермии) и распределения МНЧ в организме малых лабораторных животных *in vivo*;

Разработка методов синтеза МНЧ

В качестве основного метода получения МНЧ был выбран метод термического разложения металлсодержащих прекурсоров в высококипящих органических растворителях в силу ряда причин, в частности:

Возможность использования широкого спектра органических соединений, выступающих в роли ПАВ;

 Возможность выбора растворителя, позволяющего проводить реакцию в широком диапазоне температур;

 Возможность выбора прекурсоров с различными температурами разложениями, позволяющими обеспечить плавное увеличение концентрации металла при нагревании;

 Возможность получения МНЧ с монодисперсным распределением по размерам и контролируемой формой;

Для получения МНЧ сферической морфологии было решено использовать метод термического разложения ацетилацетоната железа (Ш) в бензиловом спирте. Кроме возможности получения монодисперсных наночастиц оксида железа, к преимуществам данного метода можно отнести относительно низкую гидрофобность бензилового спирта, что позволяет предположить возможность перевода МНЧ в водные растворы непосредственно после синтеза.

Стоит отметить, что получение анизотропных МНЧ кубической (НЧкуб) и кластерной формы (НЧкл) невозможно без использования ПАВ, сорбирующихся на поверхность МНЧ и придающих им гидрофобность. Наиболее перспективными подходами к получению МНЧ кубической формы является: 1) использование в качестве прекурсора олеата железа (III) и олеиновой кислоты (ОК) в качестве ПАВ; 2) использование в качестве прекурсора ацетилацетоната железа (III) и смеси ОК и олеиламина (ОА) в качестве ПАВ. Метод основанный на использовании олеата железа (III) позволяет получать НЧ кубической формы с размерами 10±3, 15±2 и 20±2 нм (соотношение Fe(OL)₃/OK = 9, 3, 1 соответственно), однако получение НЧ

большего размера не представляется возможным так как дальнейшее увеличение концентрации олеата железа (III) приводит к слишком высокой концентрации ОК в реакционной смеси и полной остановке роста размера НЧ более 20 нм.

Чтобы получить НЧ кубической формы большего размера можно использовать в качестве прекурсора ацетилацетонат железа (III), а не олеат железа (III). В присутствии ОК и ОА в качестве ПАВ при разложении ацетилацетоната происходит формирование олеата железа (III), который формирует НЧ, таким образом данный метод позволяет обеспечить большие количества железа в реакционной смеси, при этом не увеличивая концентрацию олеиновой кислоты и приводит к получению НЧкуб существенно большего размера. Так, используя данный метод нам удалось получить НЧкуб с размерами 15±4, 37±6 и 83±19 нм.

Получение МНЧ кластерной морфологии происходит за счет объединения небольших зародышей на этапе их формирования в одну наночастицу и их дальнейшего роста. Использование объемных ПАВ, таких как олеиновая кислота, олеиламин и другие, стерически затрудняют сближение зародышей и диффузию ионов железа к их поверхности для дальнейшего роста. Нами впервые было показано, что замена высших карбоновых кислот на карбоновые кислоты с меньшим размером углеводородного радикала, такие как циклопропанкарбоновая и циклобутанкарбоновая, позволяет облегчить диффузию ионов железа к растущей поверхности зародыша, а также сблизить единичные кристаллиты на достаточное расстояние за счет их магнитных взаимодействий.

Ранее было показано, что ионы Fe^{2+} в магнетите могут быть замещены ионами других двухвалентных переходных металлов, таких как кобальт, цинк, марганец и никель (M) с получением ферритов, в которых соотношение M:Fe может варьироваться в широких пределах, при этом максимальное содержание M приводит к получению замещенных ферритов с общей формулой MFe₂O₄. Феррит кобальта представляет наибольший интерес с точки зрения своих магнитных характеристик, так как обладает значительно более высоким значением коэрцитивной силы, обусловленной высокой магнитной анизотропией феррита кобальта. Для получения MHЧ феррита кобальта можно использовать методики, аналогичные методикам для получения магнетита, однако с заменой трети прекурсора железа на прекурсор, содержащий Co (II).

9

Получение стержневидных наночастиц (НЧст) описанными выше методами не представлялось возможным, так как для ферритов характерна кубическая симметрия, обуславливающая получение либо сферических или кубических МНЧ. В этой связи для синтеза НЧст использовали двухстадийный синтез, включающий принудительный гидролиз хлорида железа (III) приводящий к получению стержневидных наночастиц оксогидроксида железа и последующее восстановление оксогидроксида железа с образованием магнитных оксидов железа. В качестве ПАВ использовали дофамин или полиэтиленимин (ПЭИ), а в качестве восстановителя гидразин гидрат. Восстановление проводили в условиях микроволнового облучения, была оптимизирована концентрация гидразин гидрата, а также время микроволнового воздействия. Использование ПЭИ обеспечивало формирование более удлиненных НЧст (l = 21 нм, и d = 4 нм, аспектное соотношение 5,3:1), тогда как использование дофамина вызывало образование более крупных НЧст с меньшим аспектным соотношением (l=40 нм, d=10 нм, аспектное соотношение 4:1)

Таким образом, на первом этапе нами были предложены новые и усовершенствованы существующие методы получения МНЧ сферической, кубической, кластерной и стержневидной морфологии с монодисперсным распределением по размерам пригодные, для биомедицинского применения после дальнейшей модификации.

Исследование структуры и свойств полученных образцов МНЧ

Согласно данным ПЭМ, все полученные МНЧ обладали монодисперсным распределением по размерам. РФА показал, что их кристаллическая структура соответствовала структуре обращенной шпинели наблюдаемой у магнетита, пространственная группа Fd3m (Таблица 1).

Для всех образцов были получены кривые намагниченности, определена намагниченность насыщения (M_S) и коэрцитивная сила (H_c). Намагниченность насыщения возрастает при увеличении размеров НЧ, достигая максимума для НЧкуб-30. Все НЧ показывают высокие значения намагниченности насыщения, характерные для массивных образцов. Данное явление может быть объяснено магнитостатическими взаимодействиями между отдельными МНЧ магнетита, в результате которых происходит упорядочивание магнитных моментов отдельных МНЧ, приводящее к повышенным значениям M_S по принципу суперпозиции.

Шифр	Прекурсор	Форма	Размер, нм	ОКР,	Ms,	Hc,
		-	-	HM	А•м ² •кг	кА∙м⁻¹
НЧсф	Fe(acac) ₃	сфера	6±1	5	55	1,5
НЧкуб -10	Fe(OL) ₃	куб	10	9	35	3,5
НЧкуб-15	Fe(OL) ₃	куб	15	14	65	1,2
НЧкуб-20	Fe(OL) ₃	куб	20	20	70	4,3
НЧкуб-30	Fe(acac) ₃	куб	30	34	74	4,6
НЧст-N	FeCl ₃	стержень	длина:21,	-	54,4	112
			ширина:4			
НЧст-D	FeCl ₃	стержень	длина:40,	-	14,1	67
			ширина:10			
НЧклК1	Fe(acac) ₃	кластер	41±10	18	81,5	3,9
НЧклК4	Fe(acac) ₃	сфера	31±6	13	77,2	1,2
НЧклК6	Fe(acac) ₃	кластер	25±7	10	78,1	0,7
НЧклК10	Fe(acac) ₃	кластер	32±4	15	77,8	1,4
НЧклК11	Fe(acac) ₃	кластер	23±6	12	65,1	0,1
НЧклК14	Fe(acac) ₃	кластер	38±8	10	77,4	2,7
ФК-1	Fe(acac) ₃ /	куб	12 ± 1	12	44,9	5,6
	$Co(acac)_2$					
ФК-2	Fe(acac) ₃ /	куб	24 ± 3	26	56,3	115
	$Co(acac)_2$					
ФК-3	Fe(acac) ₃ /	куб	78 ± 11	31	87	68
	$Co(acac)_2$					
ФК-4	Fe(acac) ₃ /	куб	$1\overline{25\pm 21}$	32	94	33
	$Co(acac)_2$					
ФКсф	FeCl ₃ /CoCl ₂	сфера	12±4	9	75	3

Таблица 1 – Морфология, структура и магнитные свойства полученных МНЧ

Низкие значения намагниченности насыщения для образца D скорее всего объясняются наличием немагнитной фазы. Было установлено, что с увеличением среднего размера HЧ, значения M_S также возрастали с 45 $A \cdot M^2 \cdot K\Gamma^{-1}$ (ФК-1) до 94 $A \cdot M^2 \cdot K\Gamma^{-1}$ (ФК-4) при напряжённости поля $H \approx 1000$ к $A \cdot M^{-1}$, что соответствует предсказанным значениям M_S для объемного материала ($M_S = 80$ $A \cdot M^2 \cdot K\Gamma^{-1}$) а изменение значений H_C в зависимости от размера МНЧ описывается функцией экстремума. Для образца ФК-1 практически отсутствовали коэрцитивная сила и остаточная намагниченность, что предотвращает магнитные диполь-дипольные взаимодействия между отдельными НЧ и, в конечном итоге, их агрегацию.

Ввиду высокой остаточной намагниченности и в результате сильных дипольдипольных взаимодействий, НЧ ФК-2, ФК-3 и ФК-4 склонны формировать агрегаты (цепочки), что также подтверждается соответствующими ПЭМ-изображениями. По этой причине, только образцы ФК-1 и ФКсф перспективны для дальнейшего биомедицинского применения. Из полученных данных можно видеть, что средние значения ILP для образца ФКсф для двух различных напряженностей ВПМП поля хорошо согласуются друг с другом (Таблица 2).

Шифр	Индукция, H к $\mathrm{A}\cdot\mathrm{m}^{ ext{-}1}$	Частота, f кГц	SAR, $BT \cdot \Gamma^{-1}$	ILP, $H\Gamma H \cdot M^2 \cdot K\Gamma^{-1}$
ФК-1	20	261	98.4 ± 10.7	0.63 ± 0.07
	20	393	92.8 ± 8.7	0.88 ± 0.08
	9.6	393	28.7 ± 7.1	0.79 ± 0.20
ФКсф	20	261	185.8 ± 13.5	1.78 ± 0.09
		393	260.11 ± 18.6	1.65 ± 0.12
	9.6	393	55.7 ± 4.8	1.54 ± 0.13

Таблица 2 – Параметры поля и значения SAR и ILP для образца ФК-1 и ФКсф

Кроме того, полученные значения ILP в 2 раза превышают аналогичные значения для образца ФК-1, несмотря на идентичность размеров НЧ. Более высокое значение ILP для образца ФКсф, в сравнении с образцом ФК-1, можно объяснить путем сравнения значений удельной намагниченности образцов. Так, при напряженности ВПМП H=20 кА·м⁻¹, для образца ФКсф удается достичь максимальной удельной намагниченности M, которая составляет 40%· M_S или 30 А·м²·кг⁻¹, что в 2 раза выше аналогичного значения для образца ФК-1 (15 А·м²·кг⁻¹).

Разработка методик функционализации МНЧ биосовместимыми покрытиями

Полученные НЧ можно разделить на две группы: гидрофильные образцы (НЧсф, НЧст и ФКсф) и гидрофобные образцы, полученные при использовании в синтезе ПАВ и органических растворителей.

Гидрофильные образцы могут быть легко редиспергированы в дистиллированной воде, однако увеличение ионной силы или изменение pH растворов до величин, соответствующих физиологическим (pH = 7.4, концентрация NaCl = 0,9%) незамедлительно приводит к потере коллоидной стабильности. Тем не менее, чтобы обеспечить низкую токсичность МНЧ на клеточном и органном уровне нами предложено функционализировать подобные МНЧ биосовместимыми покрытиями, которые имеют заряд при физиологических значениях pH и ионной силы, а также, находясь на поверхности HЧ, создают дополнительный слой, стерически препятствующий сближению HЧ и их агрегации. Для применения в

терапии и диагностике, кроме обеспечения агрегативной устойчивости НЧ, покрытие также должно обеспечивать возможность связывания терапевтических препаратов. Наиболее предпочтительным среди таких типов покрытий являются биогенные полимеры, в частности белки, например сывороточный альбумин (СА), который обладает низкой иммуногенностью, а кроме того, связывает и переносит по организму большое число ксенобиотиков. СА растворим только в водной среде, в этой связи его использовали для стабилизации гидрофильных НЧ. Из всех типов используемых НЧ функционализацию сывороточным альбумином удалось провести только для НЧсф. НЧст в процессе синтеза уже стабилизированы либо ПЭИ, либо дофамином, тогда как образец ФКсф содержит на поверхности цитрат-ионы, что в обоих случаях препятствует сорбции СА. Для получения стабилизированных МНЧ после смешивания СА и НЧсф проводили сшивку СА глутаровым альдегидом, что обеспечило коллоидную стабильность НЧ в физиологических условиях, а также предотвратило десорбцию СА с поверхности НЧсф (Рисунок 1).



Рисунок 1 – ПЭМ микрофотография НЧсф, покрытых ЧСА в темнопольном режиме (А). Элементное картирование для N (Б), Fe (В), O (Г)

При очистке методом гельпроникающей хроматографии были выделены две агрегативно устойчивые фракции НЧ, с гидродинамическим размером 40 нм и 80 нм: НЧ-СА-40 и НЧ-СА-80. Путем ковалентной конъюгации ПЭГ к наночастицам НЧ-СА были получены ПЭГилированные НЧ (НЧ-СА-ПЭГ).

Для решения задачи влияния формы анизотропных НЧ на их применение в качестве T2 контрастного средства для MPT в экспериментах *in vivo* было необходимо получить анизотропные НЧ, которые максимально приближены по дизайну и свойствам своей поверхности между собой. Поэтому в качестве функционализирующего покрытия был выбран биосовместимый блоксополимер полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля Pluronic F-127, позволяющий получать стабильные водные коллоидные растворы, как НЧкуб и НЧкл, так и НЧ ст. Гидродинамический диаметр НЧ, полученных таким методом составлял 65±35 нм и 100 ± 40 НЧкуб (НЧкуб-Pl) НЧкл (НЧкл-Pl) НМ для И соответственно. Гидродинамический диаметр НЧст (НЧст-Pl) составил 120±42 нм.

Исследование токсичности МНЧ в экспериментах in vitro

На следующем этапе исследовали механизмы токсического действия в зависимости от размера, формы и покрытия МНЧ.

LDH и MTS тесты показали отсутствие значимого токсического эффекта вплоть до концентраций МНЧ 560 мкг/мл для НЧ-СА-ПЭГ. Исследование формирования АФК при инкубации с НЧ показало, что НЧ-СА-ПЭГ обеспечивают наименьший уровень формирования АФК по сравнению с другими типами НЧ. Как оказалось, существует корреляция между Комета тестом и DCFDA тестом. НЧ-СА-40 вызывали сильную фрагментацию ДНК в клетках фибробластов человека через 48 часов дозозависимым образом. Мы полагаем, что повреждение ДНК происходит за счет образования АФК, что подтверждается анализом DCFDA. Напротив, НЧ-СА-ПЭГ не продемонстрировали таких токсических эффектов. В совокупности наши данные показывают, что покрытие наночастиц альбумином обеспечивает стабильную и биосовместимую оболочку и уменьшает цитотоксические эффекты магнетитового ядра. Для клеток НF и U251 наибольшие токсические эффекты наблюдаются через 48 часов после воздействия НЧ. Значительное увеличение внутриклеточных АФК через 48 часов после инкубации позволяет предположить, что продукция АФК является основной причиной токсичности НЧ. Однако стабилизация НЧ ПЭГ может быть инструментом для уменьшения этих токсических эффектов.

Токсичность водных суспензий НЧкуб-РІ, НЧст-РІ и НЧкл-РІ была исследована *in vitro* с помощью MTS теста на культурах нормальных фибробластов мыши SC-1. Полученные результаты свидетельствуют о низкой токсичности всех типов НЧ, при этом значения IC₅₀ не превышали 200 мкг/мл, что позволяет их использовать в качестве контрастных агентов для MPT при внутривенном введении. Исследование формирования AФK с использованием флуоресцентного индикатора DCFDA не показало различий между контрольными клетками и клетками, инкубированными с НЧ. Окраска флуоресцентными красителями, позволяющими идентифицировать клетки, погибающие по пути апоптоза или некроза, показала, что в данных концентрациях нет достоверных различий в уровне гибели клеток путем апоптоза и некроза после инкубации с НЧ по сравнению с контрольными клетками. Полученные данные подтверждают, что создание оболочки и молекул ПЭГ вокруг НЧ обеспечивает снижение токсичности НЧ для клеточных культур.

Токсичность гидрофильных наночастиц ФКсф была также исследована на нормальной клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши SC-1. При инкубации в течение 48 часов не было обнаружено значительной клеточной гибели вплоть до концентрации 100 мкг/мл. Дополнительные исследования продукции АФК на опухолевых клеточных линиях аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 и карциномы толстой кишки мыши CT26 показали, что лишь в единичных клетках линии 4T1 усиливалась продукция АФК. Опираясь на морфологические признаки клеток, окрашенных флуоресцентным красителем DCFDA, можно сделать вывод, что данные клетки находились на стадии апоптоза – проявляли сферическую морфологию, зачастую рядом с этими клетками локализовались окрашенные апоптотические тельца. Аналогичные данные были получены для клеток линии CT-26, инкубировавшихся с ФК_{сф}.

Таким образом, все исследованные МНЧ не показывали токсического воздействия на клеточные культуры нормальных и опухолевых клеток в концентрациях пригодных для дальнейшего применения. С использованием комплекса методов показано, что наличие на поверхности ПЭГ позволяет существенно снизить формирование АФК для НЧ-СА-ПЭГ, НЧкуб-Pl, НЧст-Pl и НЧкл-Pl, тогда как для НЧ-СА-40, НЧ-СА-80 и ФКсф было обнаружено достоверное увеличение уровня АФК, что следует учитывать при проведении дальнейших экспериментов *in vivo*.

Исследования функциональной активности НЧ in vitro

Потенциал биомедицинского использования МНЧ на первом этапе оценивался в экспериментах *in vitro* исходя из предполагаемого применения полученных препаратов: 1) в качестве МРТ контрастного агента; 2) в качестве носителя для доставки лекарств; 3) в качестве агента для магнитной гипертермии.

Исследование функциональной активности НЧ для применения в MPT *in vitro*

Наиболее перспективными для дальнейшего использования в качестве контрастных агентов являются МНЧ, стабилизированные полимерами, содержащими ПЭГ. Наличие ПЭГ на поверхности МНЧ способствует снижению захвата МНЧ макрофагами ретикулоэндотелиальной системы и увеличивает время циркуляции в крови. Не менее важным является значение гидродинамического размера и дзета потенциала, которые должны быть меньше 200 нм и иметь отрицательное значение, соответственно.

Интересно отметить, ЧТО для НЧкуб значения T2 релаксивности увеличиваются с размером магнитного ядра и намагниченностью насыщения вплоть до размера НЧ равного 20 нм, однако при увеличении размеров до 30 нм происходит резкий спад значения T2 релаксивности до значений 135 мМ⁻¹с⁻¹. Мы связываем такое поведение с увеличением гидродинамического размера и потерей агрегативной стабильности в высоких полях при измерении Т2 релаксивности (Таблица 3).

Образец	ОКР, нм	Удельная	Т2-	Гидродинамический	ζ-
		намагничен	релаксив-	размер после	потенциа
		ность	ность,	конъюгации с	л, мВ
		насыщения	мМ-1с-1.	Pluronic F-127, нм	
		$M_{\rm S}$, ${\rm Am}^2 \cdot {\rm Kg}^{-1}$			
НЧ _{куб} -10	9,4±0,1	35	190	99±3	-11±3
НЧ _{куб} -15	$14,1\pm0,2$	65	300	100±2	-13±2
НЧ _{куб} -20	20,2±0,1	70	367	107±7	-12±4
НЧ _{куб} -30	34,9±0,1	74	135	130±2	-11±2

Таблица 3 – Физико-химические характеристики НЧкуб, стабилизированных Pluronic F-127

Основные параметры НЧ не кубической морфологии со схожим размером кристаллита, предполагаемых к использованию для диагностики опухолей приведены ниже (Таблица 4)

Таблица 4 –	Основные	характеристики	ΗЧ	используемых	для	MPT	диагностики
опухолей							

Название образца	Покрытие наночастиц	Размер кристал- лита, нм	Гидродина мический размер, нм	ζ- потенциал, мВ	Т2- релакси в-ность, мМ ⁻¹ с ⁻¹	Удельная намагничен ность насыщения <i>M</i> _S , Ам ² ·кг ⁻¹ ,
НЧ-СА-ПЭГ	ЧСА-ПЭГ	5±2	35	-35.0	160	55,0
НЧкуб-РІ	Pluronic F127	14,1±0,2	65	-18.5	300	65,0
НЧст-РІ	Pluronic F127	-	120	-19.0	51	54,4
НЧкл-Pl	Pluronic F127	18,4±3	100	-12.0	109	80,5

Из данной таблицы видно, что все типы НЧ обладают способностью сокращать время T2 релаксации протонов в водных растворах. Из всех полученных МНЧ наименьшим значением T2 релаксивности обладают НЧст. Учитывая наибольший гидродинамический размер по сравнению с размером кристаллита такое низкое значение может быть объяснено агрегацией нескольких магнитных ядер внутри одной наночастицы, что приводит к уменьшению объема раствора, попадающего в градиент магнитного поля, создаваемого НЧ, а, следовательно, и уменьшению T2 релаксивности. Максимальное значение T2 релаксивности наблюдается для НЧкуб-Pl.

Сравнивая значения T2 релаксивности НЧ различной формы, размера кристаллита и гидродинамического размера можно сделать вывод о том, что с увеличением ОКР для НЧкуб происходит увеличение значения намагниченности насыщения, и как следствие увеличение параметра T2 релаксивности. Сравнивая влияние формы на параметр T2 релаксивности было выявлено, что НЧкуб и НЧкл наиболее перспективны в качестве контрастных агентов для MPT.

Исследование функциональной активности НЧ для доставки лекарств in vitro

Человеческий сывороточный альбумин, используемый для функционализации НЧ-СА-ПЭГ в принципе, обладает высоким сродством к ксенобиотикам и большое количество лекарственных препаратов переносится по организму именно в связанном с СА виде.

В качестве модельных препаратов, были использованы доксорубицин (Докс) и фотосенсибилизатор (ФС) бактериохлоринового ряда.

Оба препарата удобны для оптической визуализации, а также обладают выраженным противоопухолевым действием (для Φ C в режиме Φ ДТ). Наиболее предпочтительным методом иммобилизации лекарственных препаратов является электростатическое взаимодействие и π -стэкинг. Этот механизм загрузки лекарственного средства имеет явное преимущество по сравнению с ковалентной иммобилизацией, поскольку он не изменяет химическую структуру лекарственного средства, что полностью сохраняет функциональную активность лекарственного средства. Наши эксперименты демонстрируют, что частицы НЧ-СА-ПЭГ, нагруженные Докс, остаются агрегативно стабильными и практически не изменяют размер вплоть до содержания Докс равного 8% масс.

Также было показано pH зависимое высвобождение Докс. Согласно полученным данным, при pH 7.4 количество высвободившегося Докс не превышает 25% от веса исходного содержания лекарства в HЧ-СА-ПЭГ. В кислых условиях процесс идет быстрее, и при pH=6.5 и pH=5.5 через 25 ч полученные значения концентрации Докс составляют 55 и 75% соответственно. Таким образом, HЧ-СА-ПЭГ, доставленные в ткань опухоли, могут демонстрировать более быстрое высвобождение Докс в этой области, обеспечивая направленную и чувствительную к pH доставку лекарственного средства.

Для увеличения терапевтической эффективности наноструктурированных препаратов наряду со стимул чувствительным высвобождением лекарства популярным подходом является активная доставка за счет опухольспецифических лигандов. Одним из таких лигандов является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – белковая сигнальная молекула, активирующая неоангиогенез и гиперэкспрессированная на поверхности ряда опухолевых клеток, в частности аденокарциномы молочной железы. Для увеличения специфичности доставки к опухолевым клеткам аденокарциномы 4T1 мыши НЧ-СА-ПЭГ, загруженные доксорубицином, были дополнительно конъюгированы с моноклональными антителами к VEGF. После конъюгации НЧ-СА-ПЭГ с антителами к VEGF

(НЧ-СА-ПЭГ-VEGF) методами конфокальной сканирующей микроскопии и проточной цитометрии нами было подтверждено увеличение специфичности связывания НЧ-СА-ПЭГ-VEGF с клетками аденокарциномы молочной железы мыши 4T1. По результатам проточной цитометрии доля клеток связывающих МНЧ составила 6 и 15 % для клеток опухолевой культуры 4T1 мыши для МНЧ, связанных с неспецифическими иммуноглобулинами класса G (НЧ-СА-ПЭГ-IgG) и для НЧ-СА-ПЭГ-VEGF соответственно. Результаты конфокальной микроскопии показали, что НЧ-СА-ПЭГ-VEGF способны эффективно связываться с мембраной клеток 4T1 в отличие от НЧ-СА-ПЭГ IgG (Рисунок 2) и способствовать более эффективной доставке Докс в ядро опухолевых клеток.



Рисунок 2 – Флуоресцентные фотографии клеток 4T1 после взаимодействия с H4-CA-ПЭГ-VEGF (верхняя панель) и H4-CA-ПЭГ-IgG (нижняя панель). А - совмещенное изображение, Б – флуоресценция DAPI, В – флуоресценция иммуноглобулинов козы, специфичных к иммуноглобулинам мыши. Масштабная шкала – 20 мкм

Наличие на поверхности НЧ СА и успешная иммобилизация Докс позволяют предположить, что такие наночастицы представляют собой универсальный инструмент для создания систем доставки терапевтических средств, обладающих амифифильной природой и имеющих первичную аминогруппу (цисплатин, метотрексат и т. п.). В качестве примера нами была осуществлена загрузка производного бактериохлорина *a*, дополнительно несущего аминогруппу. Для поиска наиболее эффективного ФС нами было использовано три производных бактериохлорина *a*: 1) ФС4; 2) ФС6; 3) ФС8, различающиеся длиной углеродного линкера между порфириновым кольцом и аминогруппой, составляющей 4, 6 или 8 атомов углерода соответственно. Полученные НЧ-СА-ПЭГ-ФС обладают гидродинамическим размером 88, 68 и 64 нм, а емкость загрузки равна 43%, 62% и 53% для ФС4, ФС6 и ФС8 соответственно. Такая высокая емкость загрузки по сравнению с Докс, обусловлена более высокой гидрофобностью ФС, и смещению равновесия между свободной формой ФС, нерастворимой в полярных растворителях, в сторону формы ФС, иммобилизованной в гидрофобных карманах СА.

Биомедицинское использование многокомпонентных систем на основе МНЧ и ФС требует подтверждения целостности полученных систем доставки в экспериментах *in vitro*. Ключевой вопрос, стоящий перед исследователем – действительно ли лекарственный препарат находится в составе наночастицы, а не представлен отдельными молекулами в растворе и не происходит ли высвобождения лекарственного средства до попадания наночастицы в клетки или ткани. Для этого нами были получены координационные соединения ФС с медью (II), которые могут быть легко идентифицированы с помощью метода ПЭМ, совмещенного с энергодисперсионным элементным картированием (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Элементное картирование НЧ-СА-ПЭГ, несущих Φ С в темнопольном режиме для Cu (A), Fe (Б), C (В), Fe и Cu (Г)

При изучении НЧ-СА-ПЭГ, несущих молекулы ФС с атомом меди, была показана четкая локализация сигнала от атомов меди с сигналом от железа, входящего в состав наночастиц. Кроме этого, сигнал от атомов меди локализовался с сигналом от азота, который входит в состав, как самого ФС, так и белковой оболочки наночастиц. Таким образом, можно сделать вывод о прочной иммобилизации молекул ФС на НЧ-СА-ПЭГ в физиологических условиях.

На следующем этапе была исследована световая и темновая цитотоксичность НЧ@ФС. Для клеток СТ26 значение IC₅₀ при отсутствии облучения светом почти в 60 раз выше, чем при облучении. Для НЧ-СА@ФС6 и НЧ-СА@ФС8 значение IC₅₀ при исследовании темновой цитотоксичности больше в 22 и 19 раз чем при исследовании фотоиндуцированной токсичности, соответственно (Таблица 5).

Таблица 5 – Фотоиндуцированная и темновая цитотоксичность МНЧ@ФС на культуре клеток СТ26

IC ₅₀ , нг/мл							
Время	30 мин	2ч	4ч	темновая			
инкубации							
НЧ-СА@ФС4	195±9	70±4	44±3,5	2783±39			
НЧ-СА@ФС6	57±3	54±4,5	49±2	1093±35			
НЧ-СА@ФС8	95±7	65±4	58±4,5	1042±17			

Суммируя полученные результаты, мы можем утверждать, что иммобилизации ФС на поверхность МНЧ позволяет получить высокоэффективные водорастворимые ФС, при этом фотоактивность ФС сохраняется, что было продемонстрировано впервые. Для дальнейших исследований были выбраны МНЧ@ФС4, как проявляющие минимальную темновую токсичность.

Исследование функциональной активности НЧ для магнитной гипертермии *in vitro*

Функциональная активность НЧ в магнитной гипертермии оценивалась по способности ФКсф вызывать гибель опухолевых клеток при совместной инкубации и воздействии ВПМП. Большие концентрации МНЧ, необходимые для достижения эффективного нагрева, ограничивают применение стандартных МТS и LDH тестов, поэтому для оценки токсического воздействия ФКсф на опухолевые клетки под действием ВПМП использовали метод флуоресцентного окрашивания с использованием красителей Apopxin Deep Red (маркер апоптоза), Nuclear Green DCS1 (маркер некроза) и CytoCalcein Violet (прижизненный краситель). Таким

образом, окрашивание клеток описанными красителями позволяет выявить в популяции мертвые и живые клетки и оценить тип гибели клеток. Среди всей популяции только несколько клеток культур 4T1, CT26 и SC-1 были помечены красителями Apopxin Deep Red и Nuclear Green после 15-минутной инкубации в культуральной среде, DPBS или с Φ Kc ϕ в CO₂-инкубаторе, при этом большинство клеток положительно окрашивались CytoCalcein Violet, что свидетельствует об их жизнеспособности. МГТ при 42–43 °C в течение 15 минут также приводила к очень ограниченному окрашиванию Apopxin Deep Red и Nuclear Green во всех исследованных клеточных линиях, в то время как подавляющее большинство клеток окрашивалось CytoCalcein Violet (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Выявление механизма гибели клеток в клеточных линиях 4T1, CT26 и SC-1 после 15-минутной инкубации с МНЧ без воздействия ПМП и после МГТ при различных температурах. Маркировка клеток: красный – Арорхіп Deep Red, зеленый – Nuclear Green DCS1, синий – CytoCalcein Violet. Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка 200 мкм.

Нагревание при 46–48 °C приводило к увеличению количества клеток, окрашенных Арорхіп Deep Red. Количество клеток, помеченных Nuclear Green, также увеличилось по сравнению с таковым, вызванным МГТ при 42–43 °C. При этом многие клетки были живыми, о чем свидетельствует их положительное окрашивание CytoCalcein Violet. В случае МГТ при 58–60 °C 100% клеток окрашивались как Apopxin Deep Red, так и Nuclear Green, при этом жизнеспособные клетки не обнаруживались. Повышение продукции активных форм кислорода (АФК) наблюдалось редко во всех исследованных клеточных линиях, инкубированных в культуральной среде, DPBS или с МНЧ в СО₂-инкубаторе, а также в клетках, культивируемых в ростовой среде или DPBS в течение 15 мин воздействия ПМП.

МГТ при 42–43 °C и 46–48 °C вызывала значительную активацию продукции АФК у клеток сразу после нагревания. Активации продукции АФК после МГТ при 58–60 °C отмечено не было, так как при данном режиме нагрева не обнаруживается живых клеток. Таким образом, ФКсф являются перспективными для дальнейших in vivo исследований, а МГТ при температуре выше 46-48 °C приводит к гибели опухолевых клеток преимущественно за счет образования АФК.

Исследование функциональной активности и распределения МНЧ в организме малых лабораторных животных in vivo

Исследование распределения НЧ

При переходе от экспериментов на клеточных культурах к экспериментам на животных дополнительным фактором, ограничивающим возможность применения МНЧ, является их распределение в организме после системного введения. Для успешной доставки в целевой орган МНЧ должны избежать захвата нецелевыми органами, такими как печень, легкие или селезенка. Факторами, влияющими на распределение МНЧ в организме животных, являются размер, форма и покрытие МНЧ. При этом до настоящего исследования в литературе встречались единичные примеры систематического исследования данного вопроса.

Определение МНЧ на основе сложных оксидов железа в биологических образцах является отдельной задачей, требующей специального решения. В целом определение МНЧ в органах по измерению концентрации железа представляется возможным, однако точность определения содержания МНЧ в биологических тканях ограничена фоновым значением содержания железа в биологической ткани. Также существует возможность введения экзогенных меток в состав наночастиц, например радиоактивных или флуоресцентных. Данный метод является более чувствительным, чем прямое определение железа, но ограничен химической структурой МНЧ, которая не всегда позволяет надежно включить метку в состав НЧ.

Для исследования распределения НЧ-СА-ПЭГ после внутривенного введения в состав СА, входящего в состав оболочки, была введена радиоактивная метка ¹²⁵I. Концентрацию НЧ-СА-ПЭГ в органах после внутривенного введения оценивали при помощи измерения радиоактивности изотопа ¹²⁵I, что позволило определять концентрацию МНЧ в органах в независимости от содержания железа (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Концентрация железа в органах после введения НЧ-СА-ПЭГ

В случае НЧкуб, НЧкл и НЧст введение радиоактивной метки в состав МНЧ или в состав функционального покрытия не представляется возможным, поэтому измерение распределения проводили путем измерения содержания железа в органах с учетом содержания железа в органе в норме (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Концентрация железа в органах после введения НЧкуб, НЧкл и НЧст

Для НЧ-СА-ПЭГ, НЧкуб-РІ и НЧкл-РІ в целом наблюдается стандартная картина распределения для наноструктурированных материалов, когда наибольшая доля наночастиц накапливается в органах ретикулоэндотелиальной системы, таких как печень и селезенка как спустя 1 ч, так и спустя 24 часа. Высокие уровни содержания НЧ в сердце, легких и почках спустя 1 ч после введения обусловлены не специфическим захватом тканью, а присутствием МНЧ в сосудах ткани. Спустя 24 ч количество НЧ в данных органах снижается до фоновых значений. Для НЧ-СА-ПЭГ также было обнаружено значительное увеличение содержания НЧ в почках спустя 1ч, а также более чем 55% от введенной дозы вообще не было обнаружено в животных. Исследование мочи и кала показало, с мочой было выведено более 50% исходной дозы вещества. Дополнительно 7% было выведено с калом. В щитовидной железе также было обнаружено 7% от исходной введённой дозы. Однако накопление в щитовидной железе наиболее целесообразно связывать с неспецифическим отщеплением йода с белковой молекулы, которого невозможно избежать, используя данный метод анализа.

НЧст-РІ показали иную картину распределения в организме. Основным органом, накапливающим НЧ оказались легкие и печень, где спустя 24 часа наблюдалось достоверное повышение содержание железа, в 1,5 раза превышающее фоновые значения.

Полученные данные показывают, что форма и размер НЧ оказывает решающее влияние на распределение после внутривенного введения: стержневидная форма наночастиц способствует накоплению НЧ в легких, тогда как НЧ-СА-ПЭГ с размером ядра менее 10 нм способны выводится с мочой.

Исследование влияния формы НЧ на эффективность контрастирования опухолей методом МРТ

Ранее нами было показано, что НЧ-СА-ПЭГ в дозе 5 мг/кг эффективны в качестве контрастных агентов для МРТ диагностики опухолей, включая глиобластому и рак молочной железы.

Для оценки влияния формы НЧ на эффективность контрастирования было решено сравнить между собой НЧкуб-РІ, НЧкл-РІ и НЧст-РІ.Для визуализации были выбраны опухоли 4T1, CT26 и B16, НЧ вводились внутривенно в концентрации 5

мг/кг. Эффективность НЧ в МРТ диагностике оценивали по проценту опухолей с достоверным изменением интенсивности сигнала в опухоли (Таблица 6).

Таблица 6 – Процент опухолей с эффективным МРТ контрастированием после введения НЧ Результаты представлены, как среднее значение ± ошибка среднего. * p=0,02; **p=0,003; #p=0,037 (критерий у-квадрат)

	4T1	B16	CT26	Все опухоли
НЧкуб-РІ	100%	57±20%	70±15%	73±10% *
НЧст-Р1	60±16%	100%	30±15%	63±9% [#]
НЧкл-РІ	100%	100%	90±10%	96±4% * #
Все НЧ	82±8%	88±7% **	63±9% **	78±5%

Кроме качественного изменения интенсивности сигнала опухоли на МРТ, также было исследовано количественное содержание железа в опухолях после внутривенного введения НЧ (Рисунок 7).





В соответствии с данными о биораспределении (Таблица 6) лучший контраст, усиливающий опухоль, был выявлен в модели B16 (88% опухолей). Визуализация опухолей 4T1 также была эффективна (82% для трех типов HЧ), в то время как контрастирование (преимущественно фокальное) опухоли CT26 было обнаружено с помощью MPT только в 63% опухолей (Таблица 6). Среди исследованных HЧ, HЧкл-Pl продемонстрировали наилучшие MPT-контрастные свойства (Таблица 6). Диффузное контрастирование было обнаружено в 96% опухолей после введения HЧкл-Pl. HЧкуб-Pl и HЧст-Pl обеспечивали достоверное снижение сигнала опухоли в 73% и 63% опухолей соответственно. Интересно отметить, что HЧкуб-Pl обеспечивали лучшее контрастирование для опухолей 4T1, но не были эффективны в контрастировании опухоли B16 (100% и 57% опухолей соответственно), тогда как

обратная НЧст-РІ наблюдалась тенденция, позволяющая усиливать для контрастирование для 60% и 100% опухолей 4T1 и B16 соответственно. Среди трех типов НЧ, НЧкуб-РІ продемонстрировали самые высокие показатели релаксивности *in vitro* и лучшую эффективность доставки к опухоли. Однако НЧкл-РІ превосходили НЧкуб-Pl в контрастировании опухолей. Несоответствие между оценкой T2релаксации in vitro и in vivo, вероятно, связано с разной степенью влияния ткани на сигнал МРТ. Например, профили распределения в тканях (глубокое проникновение или поверхностное накопление) могут влиять на интенсивность и тип передачи сигналов (диффузный или локальный соответственно). Наностержни имели самую низкую Т2-релаксивность, менее эффективное накопление в опухолях, что приводило к плохим результатам МРТ в опухолях, однако по данным распределения можно предположить, что НЧст-РІ будут наиболее эффективны в случае необходимости доставки в легкие.

Исследование эффективности использования НЧ для доставки противоопухолевых препаратов in vivo

Доставку противоопухолевых препаратов *in vivo* исследовали на моделях аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 и карциномы кишечника CT26, эффективность доставки оценивали с использованием метода MPT. В качестве модельных МНЧ использовали HЧ-CA@Докс-ПЭГ-VEGF (см раздел 1.5.2.), загруженные Докс, а также HЧ-CA@ФC4. На MPT снимках можно отметить значительное уменьшение интенсивности в области соответствующей периферии опухоли через 24 часа после введения HЧ-CA@Докс-VEGF, тогда как для остальных контрольных групп животных, получавших HЧ-CA@Докс-ПЭГ или HЧ-CA@Докс-ПЭГ или HЧ-CA@Докс-ПЭГ-IgG, подобного эффекта не было отмечено.

Кривые выживаемости показывают, что медиана выживаемости в контрольной группе составляет 25.5 дней, тогда как для группы, получавшей терапию НЧ-СА@Докс-ПЭГ-VEGF данное значение равнялось 39 дням, что примерно в 1.5 раза больше, чем в контрольной группе (Рисунок 8).



Рисунок 8 – График выживаемости животных Каплана-Мейера в условиях терапии аденокарциномы молочной железы 4T1 с помощью комплексов магнитных наночастиц с Докс

Нами не было отмечено значительного снижения массы тела животных, что позволяет сделать вывод о том, что токсичность НЧ, нагруженных Докс, по крайней мере сравнима со свободным препаратом. Таким образом можно заключить, что модификация магнитных наночастиц моноклональными антителами к VEGF повышает их специфичность и облегчает доставку Докс в опухоль. Покрытие магнитных наночастиц СА и ПЭГ обеспечивает стабильную защиту от захвата клетками РЭС и обеспечивает длительную циркуляцию в крови, достаточную для терапевтического эффекта. Внутривенное введение магнитных наночастиц, нацеленных на VEGF, позволяет, как визуализировать опухоль с помощью MPT, так и проводить терапию опухоли за счет активной доставки противоопухолевого препарата.

Универсальность предложенного метода была также продемонстрирована на примере ФДТ с использованием НЧ-СА@ФС4 в качестве ФС (раздел 1.5.2). Для исследования корреляции между сигналом на МРТ от частиц и оптическим сигналом ΦC привитой **CT26** 7 мг/кг от животным с опухолью вволили НЧ-СА@ФС4 и визуализировали НЧ и ФС с помощью MPT и IVIS соответственно. Оба метода показали накопление НЧ-СА@ФС4 в исследованных опухолях (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Репрезентативные МРТ изображения(левая колонка) и флуоресцентная визуализация (правая колонка) мышей, несущих СТ26 опухоли до (А, Б) и через 4 часа после (В,Г) внутривенного введенияНЧ-СА@ФС4. Границы опухоли отмечены красным цветом

Видно, что накопление НЧ в обеих опухолях приводит к значительному снижению интенсивности сигнала за счет Т2-контрастных свойств НЧ. Одновременно мы можем видеть увеличение интенсивности флуоресценции от участков опухоли, поэтому можно сделать вывод, что оба метода показывают накопление МНЧ и ФС в одной и той же опухоли и в одно и то же время. Данный факт подтверждает содоставку НЧ и терапевтического агента, иммобилизованного за счет электростатических взаимодействий, в опухоль.

Чтобы доказать, что НЧ-СА@ФС4 можно использовать в качестве тераностического агента, позволяющего определить по МРТ время максимального накопления препарата в опухолях, были выбраны три временные точки с оптимальным (1 ч) и субоптимальным (30 мин, 240 мин) накоплением препарата в опухоли СТ26. Мыши, получавшие НЧ-СА@ФС4 без облучения, служили контролем (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Динамика роста опухоли СТ26 после ФДТ на различные сроки после внутривенного введения НЧ-СА@ФС4

В течение первой недели после лечения у всех животных, получавших ФДТ, наблюдалось замедление роста опухоли по сравнению с контрольной группой. Начиная с 10-го дня, у животных, получавших ФДТ через 240 мин после в/в введения, наблюдался рост опухоли. Обе группы, облученные через 30 и 60 мин после введения препарата, продемонстрировали выраженное ингибирование роста опухоли в течение периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Хотя существенных различий в кинетике роста опухоли между 30-минутной и 60-минутной группами не было, в первой группе рецидив был обнаружен на 14-й день, тогда как во второй все животные были свободны от опухолей до 22-го дня. В группе, облученной через 240 мин был обнаружен более высокий объем опухоли (998±72 мм³) по сравнению с группами 30 мин и 60 мин (р <0,05). Однако объем опухоли в группе 240 мин все же был меньше, чем в контроле (1598±133 мм³; р <0,05). В целом полученные результаты подтверждают принцип использования HЧ-СА@ФС4 в качестве тераностического агента для улучшения ФДТ.

Таким образом, впервые был продемонстрирован эффект доставки лекарственных препаратов, иммобилизованных на поверхность НЧ-СА-ПЭГ, в опухоли, обеспечивающий их эффективную диагностику методом МРТ и

терапевтический эффект. Полученные НЧ, содержащие магнитное ядро, белок и ПЭГ, представляют собой универсальную систему доставки лекарств.

Исследование эффективности использования НЧ для терапии опухолей методом магнитной гипертермии

Для исследования эффективности МГТ в качестве противоопухолевой терапии *in vivo* ФКсф были введены интратуморально. При этом МГТ опухолей СТ26 при 42–43 °C вызывала полную регрессию и 100% выживаемость (Рисунок 11). МГТ опухолей 4T1 при 42–43 °C приводила к достоверному уменьшению объема по сравнению с контрольными группами. Однако через 20 дней после терапии (28 дней после имплантации опухоли) большинство опухолей рецидивировали. Медиана выживаемости животных в группе МГТ+МНЧ была выше (43 дня после имплантации опухоли) по сравнению с животными, которым вводили DPBS (36 дней; долгосрочный тест, р <0,05) или МНЧ без последующего воздействия ВПМП (37.5 дней; долгосрочный тест, р<0,05) (Рисунок 11).



Рисунок 11 – Эффективность МГТ при 42–43 °С для противоопухолевой терапии 4T1 и CT26 *in vivo*. Динамика роста опухоли после подкожной имплантации опухолевых клеток 4T1 (А) или CT26 (Б) мышам линии BALB/c. Общая выживаемость мышей 4T1- (В) и CT26 (Г) после МГТ

Нагрев опухолей 4T1 до 46-48°С обеспечил 25% выживаемость, а нагрев 58-60°С – 40%. Важно, что гипертермия при 58–60°С провоцировала потерю массы тела с максимальным значением (11%) на 7-е сутки после нагревания, а вес мышей нормализовался только через 20 суток после начала терапии. Следует учитывать, что является высокометастатической моделью и выживаемость животных 4T1 определяется вторичным, а не первичным ростом опухоли. Большинство животных были выведены из эксперимента из-за нарушения дыхания, снижения активности и потери массы тела – симптомов, свидетельствующих о диссеминации метастазов 4Т1. Для изучения диссеминации метастазов эксперименты с МГТ были проведены на мышах, которым была привита опухоль 4T1-luc. Эти клетки стабильно экспрессируют белок люциферазу, что позволяет обнаруживать опухоли с помощью системы визуализации in vivo за счет биолюминесценции после введения люциферина. Однако только у 43% животных, получавших МГТ при 46–48°С, были метастазы в легких. Интенсивность свечения метастазов 4T1-luc у мышей контрольной группы была выше, чем у животных, получавших МГТ (107 имп/сек/см 2 /ср против 10⁵ соответственно), что указывает на увеличение опухолевой нагрузки. Этот эффект может быть обусловлен уменьшением массы первичной опухоли при МГТ и/или ингибированием роста вторичных опухолей. Чтобы различить эти два механизма, мы сравнили эффективность лечения опухоли 4T1 с помощью МГТ с хирургическим удалением опухоли на той же стадии роста (8-й день после имплантации). Интересно, что в то время, как МГТ излечила все первичные опухоли, операция привела к рецидиву 28% опухолей. Метастазы после МГТ выявляли реже, чем после хирургического удаления (3/7 против 6/7 мышей соответственно). В заключение мы показали, что МГТ *in vitro* и *in vivo* приводит к гибели клеток и уменьшению размеров опухоли. Термическая абляция увеличивает долгосрочную выживаемость мышей, несущих 4T1, обеспечивая клиренс первичной опухоли и ингибирование метастазирования. Таким образом, определение температуры терапии для каждого вида опухоли в отдельности может обеспечить успех МГТ в качестве противоопухолевой монотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря своим уникальным магнитным свойствам магнитные наночастицы нашли множество разных применений в области терапии и диагностики опухолевых заболеваний. Показана возможность их применения в качестве контрастных агентов для MPT, средств доставки лекарств и лекарственных препаратов для магнитной гипертермии. Тем не менее нерешенной проблемой на пути к трансляции в практическое применение остается вопрос исследования взаимосвязи между морфологией наночастицы и ее составом, физико-химическими свойствами и взаимодействием с живыми системами. В результате выполненных автором исследований были созданы новые и адаптированы существующие химические методики синтеза магнитных наночастиц с заданными формой, размером и составом и исследованы их физико-химические свойства. На основании полученных данных выявлены закономерности, определяющие зависимость эффективности магнитных наночастиц в тех или иных биомедицинских приложениях от их химического состава и морфологических параметров. В экспериментах in vivo показана терапевтическая и диагностическая эффективность магнитных наночастиц с оптимальными свойствами, выявленными комплексом физико-химических методов анализа. Проведенное исследование показывает, что морфология и состав магнитных наночастиц являются ключевыми параметрами, определяющими их физико-химические свойства и потенциал в биомедицине, а возможность контролировать данные параметры с высокой точностью открывает перспективы для получения новых, более эффективных диагностических и терапевтических лекарственных препаратов.

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

- Показано, что такие параметры как размер, форма, состав и связанные с ними физико-химические характеристики магнитных наночастиц являются ключевыми при оценке потенциала биомедицинского применения.
- 2) Использование высококипящих органических растворителей (бензилового спирта, 1-октадецена, дибензилового эфира) и ПАВ (олеиновой кислоты, олеиламина, циклических ароматических (бензойная и 1-инданкарбоновая) и алифатических (в ряду циклопропанкарбоновая – циклогексанкарбоновая) карбоновых кислот), и варьирование концентраций прекурсоров, а также режима

нагрева реакционной смеси в диапазоне 10-20 °С дает возможность получать магнитные наночастицы сферической, кубической, и стрежневой формы, а также наночастицы кластерного типа с размерами 6-40 нм.

- 3) Намагниченность насыщения кубических наночастиц оксидов железа возрастает монотонно в диапазоне размеров 20–40 нм до значения 74 $\text{Am}^2 \text{kr}^{-1}$, после чего выходит на плато. Напротив, зависимость динамических магнитных свойств наночастиц T2 релаксивности, от размера ядра имеет вид функции с экстремумом ($r_2 = 367 \text{ MM}^{-1}\text{c}^{-1}$), что согласуется с ранее предсказанными теоретическими зависимостями. Измерение тепловыделительной способности показало, что из всех исследованных образцов наночастицы феррита кобальта сферической формы с размером 9 нм обладают максимальным значением равным $1.78 \pm 0.09 \text{ нГ}\text{H}^{-1}\text{Kr}^{-1}$.
- 4) Форма и намагниченность насыщения магнитных наночастиц не влияет на возможность получения стабильных водных коллоидных растворов с монодисперсным распределением наночастиц по размерам биосовместимых полимеров при использовании полимерных покрытий, содержащих полиэтиленгликоль. Основным параметром, ограничивающим возможность получения стабильных водных коллоидных растворов, является значение коэрцитивной силы. Получение стабильных водных коллоидных растворов магнитных наночастиц всех форм, кроме стержневидной, имеющих значения коэрцитивной силы, превышающие 10 кА•м-1 не представляется возможным.
- 5) Не обнаружено достоверных различий в цитотоксическом эффекте между наночастицами кубической, кластерной и стержневидной морфологии вплоть до концентраций 200 мкг/мл.
- 6) Исследование контрастирования опухолей методом МРТ на модели опухоли карциномы толстой кишки СТ26 с использованием МНЧ показало, что МНЧ сферической, кубической и кластерной формы достоверно визуализируются в опухолевом очаге в более чем 70% случаев, тогда как стержневидные МНЧ накапливаются только в 30% случаев.
- Показано, что использование СА, модифицированного ПЭГ в качестве покрытия магнитных наночастиц сохраняет способность СА связывать амфифильные лекарственные препараты, несущие первичную аминогруппу, такие как

доксорубицин и фотосенсибилизатор бактериохлоринового ряда. Противоопухолевая терапия животных, несущих модель аденокарциномы молочной железы 4T1 с использованием НЧ-СА@Докс-ПЭГ позволяет увеличить медиану выживаемости животных на 50% с 25 до 39 дней. Использование НЧ-СА@ФС4 в качестве тераностического средства позволяет определять время максимального накопления фотосенсибилизатора в опухоли методом МРТ, которое составляет 30 минут -1 час, при этом проведение ФДТ в указанное время приводит к редуцированию опухоли СТ26 в 100% случаев.

8) НЧ феррита кобальта сферической формы диаметром 12±4 нм обладают высокой тепловыделительной способностью в переменном магнитном поле и позволяют регулировать температуру нагрева биологических образцов с точностью 1-2 °C. Контролируемый локальный нагрев опухолевой ткани до 42-23 °C приводит к гибели клеток карциномы толстого кишечника СТ26 и полному излечению животных с привитыми опухолями СТ26, но неэффективен при терапии аденокарциномы молочной железы 4T1. Контролируемый нагрев до 46-48 °C приводит к излечению 25% мышей с привитыми опухолями 4T1 и снижает частоту метастазирования из первичного очага опухоли.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ

1. Abakumov, M. A.; Goldt, A. E.; Sokolsky-Papkov, M.; Zorkina, Y. A.; Baklaushev, V. P.; Goodilin, E. A.; Kabanov, A. V.; Chekhonin, V. P. Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Cells with Vectorized Iron Oxide Nanoparticles. Bull. Exp. Biol. Med. 2011, 151 (6), 726–730.

 Abakumov, M. A.; Grinenko, N. F.; Baklaushev, V. P.; Sandalova, T. O.; Nukolova, N. V.; Semyonova, A. V.; Sokol'Ski-Papkov, M.; Vishvasrao, H.; Kabanov, A. V.; Chekhonin, V. P. Tumor-Specific Contrast Agent Based on Ferric Oxide Superparamagnetic Nanoparticles for Visualization of Gliomas by Magnetic Resonance Tomography. Bull. Exp. Biol. Med. 2012, 153 (1).

 Abakumov, M. A.; Shein, S. A.; Vishvasrao, H.; Nukolova, N. V.; Sokol'Ski-Papkov, M.; Sandalova, T. O.; Gubskii, I. L.; Grinenko, N. F.; Kabanov, A. V.; Chekhonin,
V. P. Visualization of Experimental Glioma C6 by MRI with Magnetic Nanoparticles Conjugated with Monoclonal Antibodies to Vascular Endothelial Growth Factor. Bull. Exp. Biol. Med. 2012, 154 (2).

4. Rudakovskaya, P. G.; Gerasimov, V. M.; Metelkina, O. N.; Beloglazkina, E. K.; Zyk, N. V.; Savchenko, A. G.; Shchetinin, I. V.; Salikhov, S. V.; Abakumov, M. A.; Klyachko, N. L.; Golovin, Y. I.; Mazhuga, A. G. Synthesis and Characterization of PEG-Silane Functionalized Iron Oxide(II, III) Nanoparticles for Biomedical Application. Nanotechnologies Russ. 2015, 10 (11).

5. Semkina, A.; Abakumov, M.; Grinenko, N.; Abakumov, A.; Skorikov, A.; Mironova, E.; Davydova, G.; Majouga, A. G.; Nukolova, N.; Kabanov, A.; Chekhonin, V. Core-Shell-Corona Doxorubicin-Loaded Superparamagnetic Fe3O4 Nanoparticles for Cancer Theranostics. Colloids Surfaces B Biointerfaces 2015, 136, 1073–1080.

6. Abakumov, M. A.; Nukolova, N. V.; Sokolsky-Papkov, M.; Shein, S. A.; Sandalova, T. O.; Vishwasrao, H. M.; Grinenko, N. F.; Gubsky, I. L.; Abakumov, A. M.; Kabanov, A. V.; Chekhonin, V. P. VEGF-Targeted Magnetic Nanoparticles for MRI Visualization of Brain Tumor. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 2015, 11 (4), 825–833.

7. Semkina, A. S.; Abakumov, M. A.; Abakumov, A. M.; Nukolova, N. V.; Chekhonin, V. P. Relationship between the Size of Magnetic Nanoparticles and Efficiency of MRT Imaging of Cerebral Glioma in Rats. Bull. Exp. Biol. Med. 2016, 161 (2), 292– 295.

8. Nikitin, A.; Fedorova, M.; Naumenko, V.; Shchetinin, I.; Abakumov, M.; Erofeev, A.; Gorelkin, P.; Meshkov, G.; Beloglazkina, E.; Ivanenkov, Y.; Klyachko, N.; Golovin, Y.; Savchenko, A.; Majouga, A. Synthesis, Characterization and MRI Application of Magnetite Water-Soluble Cubic Nanoparticles. J. Magn. Magn. Mater. 2017, 441, 6–13.

9. Semkina, A. S.; Abakumov, M. A.; Grinenko, N. F.; Lipengolts, A. A.; Nukolova, N. V.; Chekhonin, V. P. Magnetic Resonance Imaging of Tumors with the Use of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles as a Contrast Agent. Bull. Exp. Biol. Med. 2017, 162 (6).

10. Naumenko, V.; Garanina, A.; Nikitin, A.; Vodopyanov, S.; Vorobyeva, N.; Tsareva, Y.; Kunin, M.; Ilyasov, A.; Semkina, A.; Chekhonin, V.; Abakumov, M.; Majouga, A. Biodistribution and Tumors MRI Contrast Enhancement of Magnetic Nanocubes, Nanoclusters, and Nanorods in Multiple Mice Models. Contrast media & amp; Mol. imaging 2018, 2018, 8264208.

11. Abakumov, M. A.; Prelovskaya, A. O.; Ternovoy, S. K.; Demikhov, E. I.; Majouga, A. G.; Chekhonin, V. P. Preclinical Studies of Effectiveness and Safety of Iron Oxide Nanoparticles Based MRI Contrast Agent for Tumor Diagnostics. Russ. Electron. J. Radiol. 2018, 8 (4), 237–241.

12. Nikitin, A. A.; Naumenko, V. A.; Vodopyanov, S. S.; Garanina, A. S.; Fedorova, N. D.; Kalabay, E. D.; Savchenko, A. G.; Abakumov, M. A.; Majouga, A. G. Study of the Contrasting Effectiveness of Various Tumors Types Using Cubic Magnetite Nanoparticles. Bull. Sib. Med. 2018, 17 (1), 139–148.

13. Semkina, A. S.; Abakumov, M. A.; Skorikov, A. S.; Abakumova, T. O.; Melnikov, P. A.; Grinenko, N. F.; Cherepanov, S. A.; Vishnevskiy, D. A.; Naumenko, V. A.; Ionova, K. P.; Majouga, A. G.; Chekhonin, V. P. Multimodal Doxorubicin Loaded Magnetic Nanoparticles for VEGF Targeted Theranostics of Breast Cancer. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 2018, 14 (5), 1733–1742.

14. Nikitin, A. A.; Shchetinin, I. V.; Tabachkova, N. Y.; Soldatov, M. A.; Soldatov, A. V.; Sviridenkova, N. V.; Beloglazkina, E. K.; Savchenko, A. G.; Fedorova, N. D.; Abakumov, M. A.; Majouga, A. G. Synthesis of Iron Oxide Nanoclusters by Thermal Decomposition. Langmuir 2018, 34 (15), 4640–4650.

15. Abakumov, M. A.; Semkina, A. S.; Skorikov, A. S.; Vishnevskiy, D. A.; Ivanova, A. V.; Mironova, E.; Davydova, G. A.; Majouga, A. G.; Chekhonin, V. P. Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles: Size and Coating Effects. J. Biochem. Mol. Toxicol. 2018.

16. Nguyen, T. L.; Nizamov, T. R.; Abakumov, M. A.; Shchetinin, I. V.; Savchenko, A. G.; Majouga, A. G. Effect of Magnetite Nanoparticle Morphology on the Parameters of MRI Relaxivity. Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2018, 82 (9), 1214–1221.

17. Ostroverkhov, P.; Semkina, A.; Naumenko, V.; Plotnikova, E.; Yakubovskaya, R.; Vodopyanov, S.; Abakumov, A.; Majouga, A.; Grin, M.; Chekhonin, V.; Abakumov, M. HSA—Coated Magnetic Nanoparticles for Mri-Guided Photodynamic Cancer Therapy. Pharmaceutics 2018, 10 (4).

18. Naumenko, V. A.; Garanina, A. S.; Vodopyanov, S. S.; Nikitin, A. A.; Prelovskaya, A. O.; Demikhov, E. I.; Abakumov, M. A.; Majouga, A. G.; Chekhonin, V.

P. Magnetic Resonance Imaging for Predicting Personalized Antitumor Nanomedicine Efficacy. Bull. Russ. State Med. Univ. 2018, 7 (6), 21–24.

19. Ostroverkhov, P. V.; Semkina, A. S.; Naumenko, V. A.; Plotnikova, E. A.; Melnikov, P. A.; Abakumova, T. O.; Yakubovskaya, R. I.; Mironov, A. F.; Vodopyanov, S. S.; Abakumov, A. M.; Majouga, A. G.; Grin, M. A.; Chekhonin, V. P.; Abakumov, M. A. Synthesis and Characterization of Bacteriochlorin Loaded Magnetic Nanoparticles (MNP) for Personalized MRI Guided Photosensitizers Delivery to Tumor. J. Colloid Interface Sci. 2019, 537, 132–141.

20. Nikitin, A.; Khramtsov, M.; Garanina, A.; Mogilnikov, P.; Sviridenkova, N.; Shchetinin, I.; Savchenko, A.; Abakumov, M.; Majouga, A. Synthesis of Iron Oxide Nanorods for Enhanced Magnetic Hyperthermia. J. Magn. Magn. Mater. 2019, 469, 443–449.

21. Naumenko, V.; Nikitin, A.; Kapitanova, K.; Melnikov, P.; Vodopyanov, S.; Garanina, A.; Valikhov, M.; Ilyasov, A.; Vishnevskiy, D.; Markov, A.; Golyshev, S.; Zhukov, D.; Alieva, I.; Abakumov, M.; Chekhonin, V.; Majouga, A. Intravital Microscopy Reveals a Novel Mechanism of Nanoparticles Excretion in Kidney. J. Control. Release 2019, 307, 368–378.

22. Ostroverkhov, P.; Semkina, A.; Nikitin, A.; Smirnov, A.; Vedenyapina, D.; Vlasova, K.; Kireev, I.; Grin, M.; Chekhonin, V.; Majouga, A.; Abakumov, M. Human Serum Albumin as an Effective Coating for Hydrophobic Photosensitizes Immobilization on Magnetic Nanoparticles. J. Magn. Magn. Mater. 2019.

23. Chekhonin, V. P.; Abakumov, M. A.; Mazhuga, A. G.; Bagdinova, A. N.; Demikhov, E. I.; Demikhov, T. E.; Mishkinis, B. Y.; Konstantinov, M. V; Tarasov, V. P.; Shumm, B. A.; Gippius, A. A.; Gervits, N. V; Shumm, A. B. Relaxation Properties of Contrast Media for MRI Based on Iron Oxide Nanoparticles in Different Magnetic Fields. Bull. Exp. Biol. Med. 2019, 167 (1), 97–99.

24. Nguyen, T. L.; Nizamov, T. R.; Abakumov, M. A.; Shchetinin, I. V.; Majouga, A. G.; Savchenko, A. G. Hyperthermal Effect of Cubic Magnetic Nanoparticles. Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. 2019, pp 1294–1299.

Gervits, N. E.; Gippius, A. A.; Tkachev, A. V; Demikhov, E. I.; Starchikov,
S. S.; Lyubutin, I. S.; Vasiliev, A. L.; Chekhonin, V. P.; Abakumov, M. A.; Semkina, A.
S.; Mazhuga, A. G. Magnetic Properties of Biofunctionalized Iron Oxide Nanoparticles as

Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. Beilstein Journal of Nanotechnology. 2019, pp 1964–1972.

26. Levada, K.; Pshenichnikov, S.; Omelyanchik, A.; Rodionova, V.; Nikitin, A.; Savchenko, A.; Schetinin, I.; Zhukov, D.; Abakumov, M.; Majouga, A.; Lunova, M.; Jirsa, M.; Smolková, B.; Uzhytchak, M.; Dejneka, A.; Lunov, O. Progressive Lysosomal Membrane Permeabilization Induced by Iron Oxide Nanoparticles Drives Hepatic Cell Autophagy and Apoptosis. Nano Convergence. 2020, 7, 17

27. Garanina, A. S.; Naumenko, V. A.; Nikitin, A. A.; Myrovali, E.; Petukhova, A. Y.; Klimyuk, S. V; Nalench, Y. A.; Ilyasov, A. R.; Vodopyanov, S. S.; Erofeev, A. S.; Gorelkin, P. V; Angelakeris, M.; Savchenko, A. G.; Wiedwald, U.; Majouga Dr, A. G.; Abakumov, M. A. Temperature-Controlled Magnetic Nanoparticles Hyperthermia Inhibits Primary Tumor Growth and Metastases Dissemination. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2020, 25, 102171.

28. Патент № 2723894 Российская Федерация, МПК А61К 33/26 (2006.01), B82B 1/00 (2006.01), A61B 5/055 (2006.01), A61К 49/06 (2006.01), A61Р 35/00 (2006.01), B82Y 5/00 (2011.01). Способ получения препарата для диагностики новообразований методом магнитно-резонансной томографии: № 2019123980: заявл. 30.07.2019: опубл. 18.06.2020 / Абакумов М. А., Семкина А. С., Чехонин В. П., Мажуга А. Г.; заявитель Абакумов М. А., Семкина А. С. – 20 с.: ил.

29. Патент № 2530762 Российская Федерация, МПК А61В 5/055 (2006.01), В82В 1/00 (2006.01), А61К 49/16 (2006.01). Способ диагностики мультиформной глиобластомы с помощью МРТ: № 2012153952/14: заявл. 14.12.2012: опубл. 10.10.2014 / Абакумов М. А., Губский И. Л., Кабанов А. В., Чехонин В. П.; заявитель ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. – 12 с.: ил.

30. Патент № 2659949 Российская Федерация, МПК А61В 5/055 (2006.01), А61К 33/00 (2006.01), А61К 33/26 (2006.01), А61К 49/06 (2006.01), А61Р 35/00 (2006.01), В82В 1/00 (2006.01), В82Ү 5/00 (2011.01). Способ получения препарата на основе магнитных наночастиц (МНЧ) оксида железа для МРТ-диагностики новообразований: № 2017138992: заявл.: 09.11.2017: опубл.: 04.07.2018 / Абакумов М. А., Мажуга А. Г.; заявитель НИТУ «МИСиС» – 15 с.: ил.

31. Патент № 2657545 Российская Федерация, МПК А61К 47/40 (2006.01), В82В 1/00 (2006.01), А61Р 35/00 (2006.01). Лекарственный препарат для лечения

рака молочной железы: № 2017129371: заявл. 17.08.2017: опубл. 14.06.2018 / Абакумов М. А., Семкина А. С., Чехонин В. П.; заявитель Абакумов М. А., Семкина А. С. – 11 с.: ил.

32. Патент № 2723932 Российская Федерация, МПК А61К 49/06 (2006.01), B82B 1/00 (2006.01), А61К 33/26 (2006.01), А61В 5/055 (2006.01), А61Р 35/00 (2006.01), B82Y 5/00 (2011.01). Препарат для диагностики новообразований методом магнитно-резонансной томографии: № 2019123981: заявл.: 30.07.2019: опубл.: 18.06.2020 / Абакумов М. А., Семкина А. С., Чехонин В. П., Мажуга А. Г.; заявитель Абакумов М. А., Семкина А. С. – 19 с.: ил.

33. Патент № 2712212 Российская Федерация, МПК А61К 9/127 (2006.01), А61К 31/4375 (2006.01), А61К 31/704 (2006.01), А61Р 35/00 (2006.01). Способ лечения онкологических заболеваний с помощью инъекций лекарственного препарата: № 2019134449: заявл. 28.10.2019: опубл. 27.01.2020 / Абакумов М. А., Науменко В. А., Водопьянов С. С., Власова К. Ю., Мажуга А. Г.; заявитель НИТУ «МИСиС». – 13 с.

34. Патент № 2686931 Российская Федерация, МПК С01G 49/08 (2006.01), B01J 19/12 (2006.01), B82B 3/00 (2006.01), B82Y 30/00 (2011.01), B82Y 5/00 (2011.01), A61P 35/00 (2006.01), A61K 33/26 (2006.01), A61K 41/00 (2006.01), A61K 49/06 (2006.01). Способ получения стержневых наночастиц магнетита: № 2017144639: заявл. 19.12.2017: опубл. 06.05.2019 / Никитин А. А., Храмцов М. А., Абакумов М. А., Мажуга А. Г.; заявитель МГУ им. М.В.Ломоносова. – 12 с.: ил.

35. Патент № 2664062 Российская Федерация, МПК С01G 49/08 (2006.01), B82B 3/00 (2006.01), B82Y 30/00 (2011.01), A61K 49/18 (2006.01). Способ получения кластеров из наночастиц магнетита: № 2016151256: заявл. 26.12.2016: опубл. 14.08.2018 / Никитин А. А., Федорова М. Ф., Щетинин И. В., Абакумов М. А., Белоглазкина Е. К., Клячко Н. Л., Головин Ю. И., Савченко А. Г., Мажуга А. Г.: заявитель МГУ им. М.В.Ломоносова. – 11 с.

36. Абакумов М.А. Создание препаратов для терапии и диагностики злокачественных новообразований / П.В. Островерхов, М.А. Абакумов, В.П. Чехонин [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы IX международного конгресса, Москва, 20 – 22 февраля 2017 года. Том 2. – Москва: ООО «РЭД ГРУПП», 2017. – С. 502-504.

37. Абакумов М.А. Магнитные наночастицы как перспективный материал для создания тераностиков / А.С. Семкина, М.А. Абакумов, В.П. Чехонин [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы международного форума, Москва, 23 – 25 мая 2018 года. Выпуск 16. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью «Русские Экспо Дни Групп», 2018. – С. 264-266.

38. Абакумов М.А. Адресная доставка систем на основе магнитных наночастиц в опухоль: роль патофизиологических особенностей опухоли / М.А. Абакумов, А.Г. Першина, О.Я. Брикунова, А.М. Демин, А.Г. Мажуга [и др.] // Биотехнология – медицине будущего: Материалы всероссийской мультиконференции с международным участием, Новосибирск, 29 июня – 02 июля 2019 года. – Новосибирск: ООО «Офсет-TM», 2019. – С. 79.

39. Abakumov M.A. Magnetic nanoparticles for cancer therapy and diagnostics: effects of morphology and coating // 1ts Training Workshop & Summer School on Magnetic Nanohybrids for Cancer Therapy: Book of abstracts, August 25-28, 2020, Thessaloniki-Greece. – 62 p. P. 25.

40. Абакумов М.А. Магнитные наночастицы в биомедицине: от синтеза к применению / М.А. Абакумов, А.А. Никитин, А.С. Семкина, А.Г. Савченко, В.П. Чехонин, А.Г. Мажуга // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «IV Байкальский материаловедческий форум», Улан-Удэ - оз. Байкал, 1-7 июля 2022 г. – Улан-Удэ: Бурятский научный центр Сибирского отделения РАН, 2022. – С.210-211.

41. Abakumov M.A. Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnostic // III International Baltic Conference on Magnetism (IBCM – 2019): Book of abstracts, August 18-19, 2019, Kaliningrad, Russia. – 188 p. P. 10.

42. Abakumov M.A., Nikitin N.A., Savchenko A.G., Chekhonin V.P. Magnetic Nanoparticles in Biomedicine: Current Applications and Future Perspectives // 1st International Conference APRICOT "Magnetic nanomaterials in biomedicine: synthesis and functionalization": Book of Abstracts, March 1-4, 2023, Yeravan, Armenia. – 74 p. P. 15.

43. Абакумов М.А. Генетически кодируемые магнитные наночастицы для неинвазивной визуализации стволовых клеток / М.А. Абакумов, А.Н. Габашвили, М.В. Ефремова, А.С. Семкина // Оптогенетика+ 2023: Сборник научных трудов.

Тезисы докладов III Всероссийской научной конференции с международным участием и Школы по современным методам неинвазивного контроля нейронной активности, Санкт-Петербург, 06 – 08 апреля 2023 года / Под общей редакцией М.Л. Фирсова. – Санкт-Петербург: ООО «Издательство BBM», 2023 – С. 6.

44. Абакумов М.А. Магнитные наночастицы в биомедицине: от синтеза к применениям / М.А. Абакумов, А.А. Никитин, В.П. Чехонин, А.Г. Мажуга // Химия, физика, биология: пути интеграции: Сборник тезисов докладов Х Всероссийской научной молодежной школы-конференции, Москва, 22-24 апреля 2024 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН), 2024. – С. 12.