

Миркасымов Азиз Бахтиярович

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

Специальность: 1.5.3 Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Научный руководитель**

д.б.н., академик РАН, профессор Деев Сергей Михайлович

**Официальные оппоненты:**

Авдонин Павел Владимирович, доктор биологических наук, профессор, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, лаборатория физиологии рецепторов и сигнальных систем, заведующий лабораторией

Абакумов Максим Артемович, кандидат химических наук, доцент кафедры физического материаловедения и заведующий лабораторией «Биомедицинские наноматериалы» Национального исследовательского технологического университета Московский государственный институт стали и сплавов (НИТУ «МИСиС»)

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Защита состоится 18 января 2023 г. в 11:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
д.ф.-м.н. В. А. Олейников



### **Актуальность исследования**

За последние десятилетия наномедицина открыла новые перспективы для диагностики и лечения рака, обеспечив высококонтрастную прижизненную визуализацию, эффективную адресную доставку лекарств и возможность контролируемого высвобождения лекарств. Установлено, что противоопухолевые препараты, инкапсулированные в наноконтейнеры, способны смягчать побочные эффекты при системном введении и увеличивать эффективность доставки к опухолям. Однако система мононуклеарных фагоцитов (СМФ) (также называемая ретикулоэндотелиальной системой или РЭС) быстро распознает и изолирует системно вводимые наночастицы (НЧ), ограничивая время их циркуляции в кровотоке и последующее накопление в тканях-мишенях так, что в среднем лишь 0,7% вводимых внутривенно наноагентов достигает опухоли в организме. Кроме того, накопление частиц в главных органах СМФ, печени и селезенке потенциально может привести к неблагоприятным побочным эффектам.

Термин СМФ охватывает системы клеток фагоцитов различных органов, в первую очередь, печени и селезенки, которые представляют собой первый барьер, с которым сталкиваются НЧ при системном введении. СМФ блокада подразумевает временное снижение фагоцитарной активности макрофагов за счет захвата малотоксичных «блокирующих» агентов, обычно липосом или других наночастиц. В результате терапевтические или диагностические частицы, введенные после индукции СМФ блокады, значительно медленнее захватываются из кровотока макрофагами, дольше циркулируют и лучше накапливаются в ткани-мишени. Однако необходимость в большой дозе блокирующего агента (сотни мг на кг массы тела) вызывает опасения по поводу токсичности данного подхода. Таким образом, оптимальный блокирующий агент с точки зрения его эффективности и биосовместимости считается краеугольным камнем метода СМФ блокады, а для разработки блокаторов СМФ нового поколения необходимы системные исследования влияния параметров широко спектра частиц на их блокирующие свойства.

### **Степень проработанности темы исследования**

Было разработано несколько стратегий, позволяющих избежать выведения НЧ клетками СМФ и продлить циркуляцию частиц в кровотоке. Различные инженерные подходы включают, например, модификацию поверхности «стелс»-покрытиями, такими как полиэтиленгликоль, конъюгацию с ауто-пептидами или «don't eat me» белками, связывание с дисопсонидами, маскировка нанолекарств мембранами эритроцитов, использование несферических агентов и др. Эти методы высокоэффективны для увеличения времени циркуляции частиц, но могут ухудшить адресную доставку, затруднить проникновение частиц в клетки или даже вызвать иммунный или воспалительный ответ. Более того, такие

методы борьбы с интенсивным поглощением макрофагами не подходят для умных наноматериалов, биокomпьютерных структур и других наноагентов, функциональность которых основана на преобразованиях архитектуры поверхности.

В то же время существует несколько методов, продлевающих циркуляцию частиц в кровотоке без модификации их структуры. К ним относятся использование клеток-переносчиков для частиц, предварительно индуцированная гибель макрофагов за счет введения клодроната/хлорида гадолиния, мягкая клеточная блокада макрофагов, либо СМФ блокада различными наноагентами.

Среди различных способов блокады макрофагов клеточная блокада, вызванная искусственно ускоренным старением эритроцитов и поглощением их макрофагами с помощью антиэритроцитарных антител, является высокоэффективным, но сопровождается временным снижением гематокрита. Липосомы и липидные эмульсии, характеризующиеся завидной биосовместимостью, также известны как широко распространенные блокаторы СМФ, хотя их эффективность не является самой высокой, достигая продления циркуляции частиц в кровотоке примерно в 3 раза. Белковые частицы, несколько полимеров и полимерных НЧ, а также неорганические наноматериалы также использовались в качестве блокаторов СМФ с умеренной эффективностью (таблица 1).

**Цель:**

- повышение эффективности доставки наноагентов в опухоль

**Задачи:**

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

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

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

### **Научная новизна исследования**

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

Кроме того, вдохновленные природным ферритином, мы синтезировали наночастицы ферригидрита и изучили возможность их применения для СМФ блокады. Частицы были покрыты карбоксиметил-декстраном и охарактеризованы с точки зрения состава, физического и гидродинамического размера,  $\zeta$ -потенциала и магнитной восприимчивости. Мы применили синтезированные НЧ ферригидрита для СМФ блокады *in vivo* и показали, что циркуляция магнитных частиц в кровотоке значительно продлевается, что приводит к улучшенному накоплению частиц в костном мозге и опухоли. Также мы показали биосовместимость такого подхода, проведя системное исследование биораспределения НЧ ферригидрита в тканях лабораторных животных и их токсичности.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

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

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

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

## Основные результаты

### СМФ блокада и биораспределение наночастиц

Для индукции блокады системы мононуклеарных фагоцитов мышам внутривенно вводили большую дозу блокирующих частиц (обычно 5 мг). После полного выведения наночастиц блокатора из кровотока вводили небольшую дозу (200 мкг) целевых наночастиц. Эффективность ингибирования фагоцитоза СМФ оценивали по продлению времени циркуляции в крови целевых наночастиц. Кинетику циркуляции наночастиц в кровотоке регистрировали неинвазивно в реальном времени в хвостовых венах и артериях мышей с помощью количественного метода МРQ. В результате были получены кинетики выведения из кровотока блокирующих и целевых наночастиц (см. пример на рис. 1). Затем кинетика циркуляции целевых НЧ аппроксимировалась моноэкспоненциальной функцией и рассчитывался период полувыведения наночастиц из кровотока. В итоге, время полувыведения целевых частиц использовали для сравнения эффективности СМФ блокады в разных экспериментах.

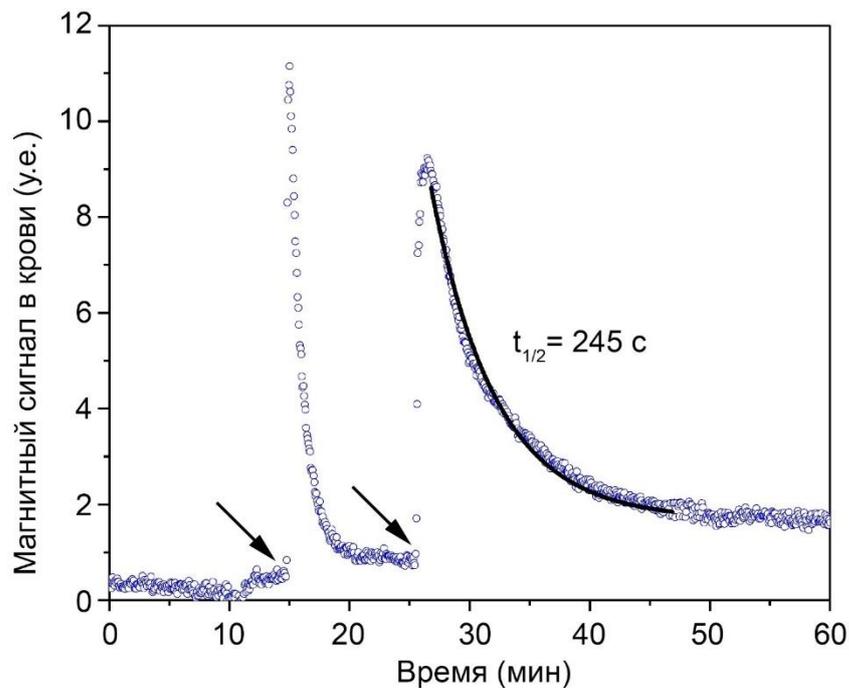


Рисунок 1. Репрезентативная кинетика выведения из кровотока частиц блокатора (первая инъекция) и целевых наночастиц (вторая инъекция). Черные стрелки указывают моменты введения частиц.

Было обнаружено (рисунок 2), что доза наночастиц блокатора в 5 мг в основном накапливалась в печени (от 60 % до 90 % в зависимости от типа НЧ) и селезенке (от 8 % до 19 %) - два основных органа системы мононуклеарных фагоцитов, ответственных за выведение из кровотока наночастиц размером более 10 нм. Низкая доза 200 мкг целевых наночастиц характеризовалась аналогичной картиной распределения: от 85 % до 90 % было обнаружено в печени, 9–14 % — в селезенке и 0–0,8 % — в легких (рисунок 3). Сходное

биораспределение блокирующих и целевых частиц *in vivo* дополнительно подтверждает возможность насыщения макрофагов высокой дозой твердых наноматериалов.

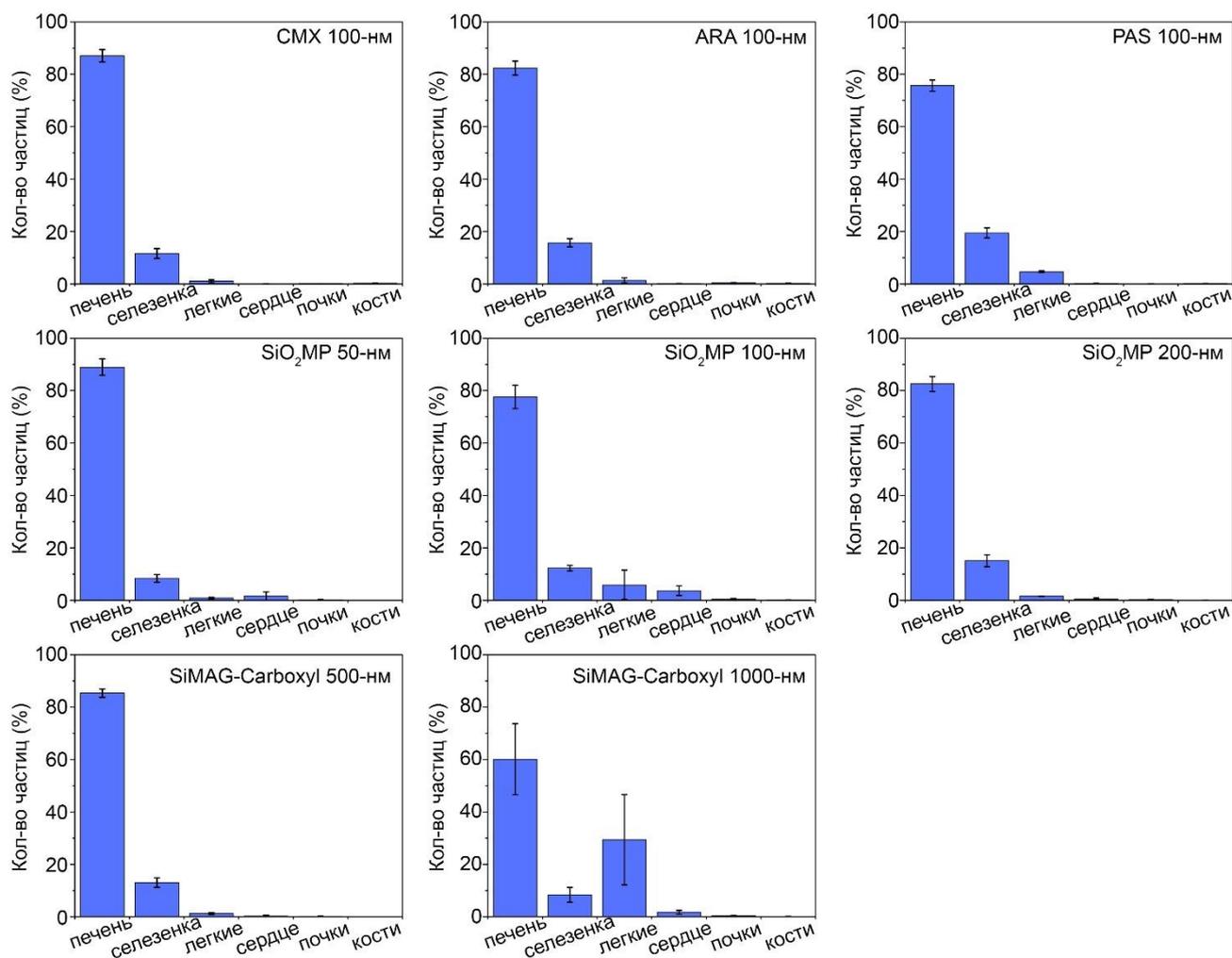


Рисунок 2. Биораспределение 5 мг различных «блокирующих» наночастиц.

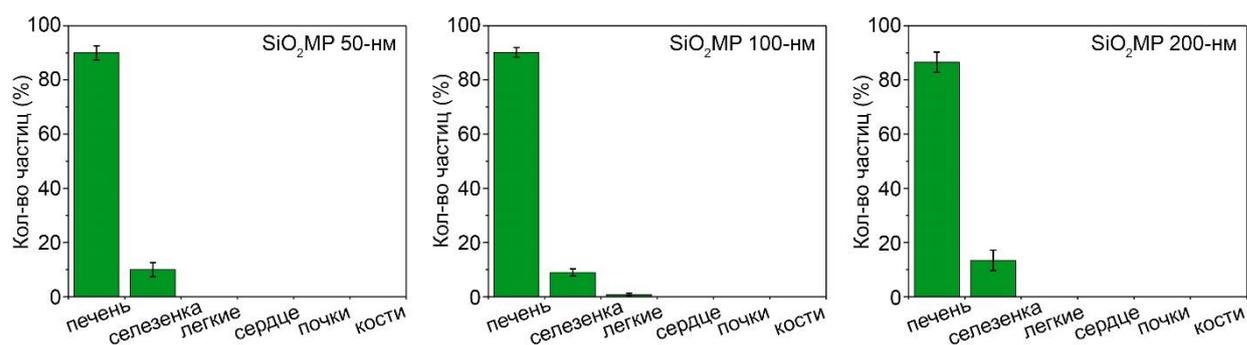


Рисунок 3. Биораспределение 200 мкг различных «целевых» магнитных наночастиц, покрытых оксидом кремния.

## Факторы, влияющие на эффективность СМФ блокады

### Доза блокирующих частиц

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

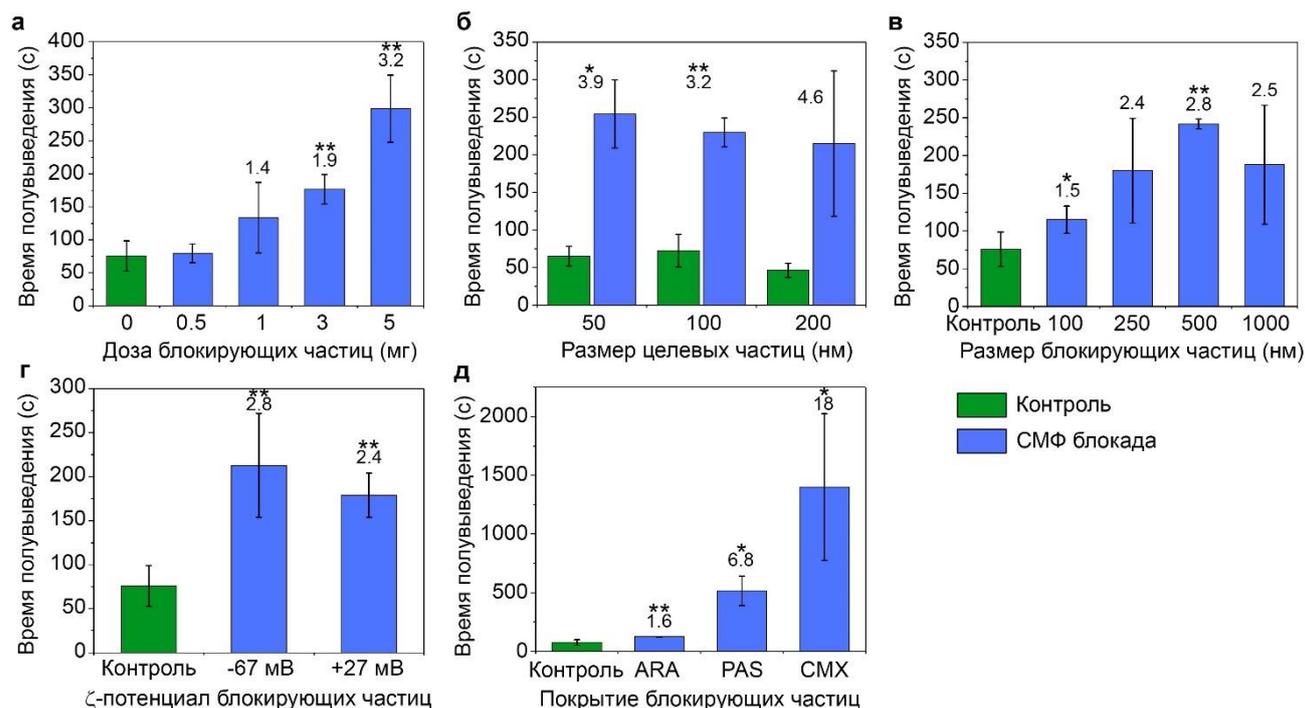


Рис. 4. Влияние на индуцированную СМФ блокаду: (а) дозы блокирующих НЧ; (б) размера целевых НЧ; (в) размера НЧ блокатора; (г) ζ-потенциала НЧ блокатора; (д) покрытия НЧ блокатора. Эффективность блокады в (а, в-д) определяется временем полувыведения из кровотока 100-нм магнитных частиц, покрытых оксидом кремния. Эффективность блокады СМФ указана над столбиками. Звездочками отмечены достоверные различия по сравнению с циркуляцией НЧ без СМФ блокады (зеленая полоса на каждом графике), t-критерий Уэлча: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ .

### Размер целевых частиц

Мы изучили, как размер целевых НЧ влияет на время их полувыведения из кровотока при СМФ блокаде. Наночастицы с размерами в диапазоне (10-200) нм обычно используются для доставки терапевтических средств *in vivo*. Поэтому для различных целевых частиц в этом диапазоне была определена пролонгация циркуляции НЧ при СМФ блокаде. СМФ блокада, индуцированная 5 мг частиц SiO<sub>2</sub> с размерами 500 нм, продлевала время циркуляции целевых частиц с размерами 50, 100, 200 нм в  $3,9 \pm 1,1$ ,  $3,2 \pm 1,0$  и  $4,6 \pm 2,3$  раза соответственно (рис. 4б). Однако разница между результатами была в основном связана с

разным временем полувыведения этих НЧ без СМФ блокады. Между тем, СМФ блокада продлевала время полувыведения любых протестированных целевых наночастиц практически до того же значения 220-250 с. Для следующих экспериментов мы выбрали 100-нм целевые НЧ с размером в середине исследуемого диапазона.

#### *Размер блокирующих частиц*

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

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

#### *ζ-потенциал и покрытие блокирующих частиц*

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

Кроме того, мы исследовали эффект СМФ блокады, используя в качестве блокаторов 100-нм частицы с различными полимерными покрытиями (рис. 4д). Частицы, покрытые глюкуроновой кислотой, увеличивали время полувыведения в 1,6 раза; с полиакриловой

кислотой – в 6,8 раза, а с карбоксиметилдекстраном – в 18 раз. Интересно, что СМФ блокада, вызванная НЧ, покрытыми полимером, была намного сильнее, чем наночастицами на основе оксида кремния.

### Линия мышей

В этом исследовании мы впервые экспериментально изучили и подтвердили влияние линии мышей на эффективность СМФ блокады, вызванной поглощением наночастиц (рис. 5а). Циркуляция целевых частиц при СМФ блокаде 500-нм частицами SiO<sub>2</sub> продлевалась в 3,4±0,9, 4,2±1,1 и 3,2±1,0 раза у мышей CD-1, C57Bl/6 и BALB/c соответственно. Этот эффект можно объяснить разницей в количестве макрофагов в печени и селезенке у разных линий мышей, а также доминирующим иммунным подтипом, влияющим на активность макрофагов по распознаванию и фагоцитозу экзогенных материалов. Таким образом, при сравнении различных исследований следует учитывать влияние линии мышей на эффективность СМФ блокады.

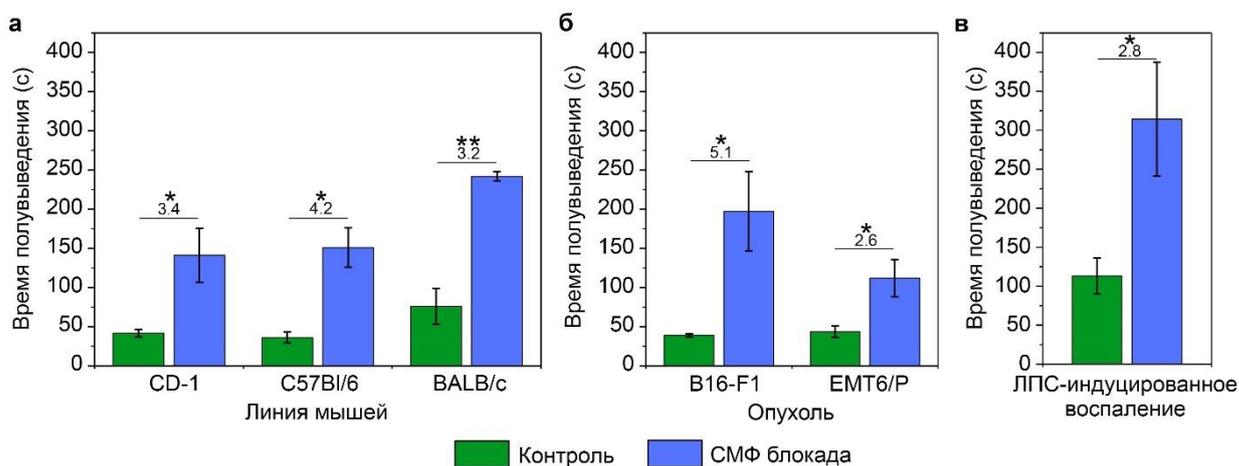


Рис. 5. Факторы животной модели, влияющие на СМФ блокаду: (а) линия мышей; (б) наличие меланомы В16-F1 (мыши C57Bl/6) или карциномы EMT6/P (мыши BALB/c); (в) воспаление, вызванное LPS (мыши C57Bl/6). Эффективность СМФ блокады указана для каждого исследования над столбиками. Статистическая разница между группами указана звездочками (t-критерий Уэлча): \* - P < 0,05; \*\* - P < 0,01.

### Влияние болезней

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

Перед экспериментами два различных типа трансплантированных опухолей, а именно меланома В16-F1 для мышей C57Bl/6 и карцинома молочной железы EMT6/P для мышей BALB/c, развивались в течение не менее недели, пока они не достигли объема 1 см<sup>3</sup>.

Опухоли повлияли на СМФ блокаду, как видно на рисунке 5б. Циркуляция целевых НЧ продлилась в  $5,1 \pm 1,3$  раза при меланоме и в  $2,6 \pm 0,7$  раза при раке молочной железы. Следует отметить, что в исследовании с опухолью ЕМТ6/Р время циркуляции значительно сократилось при отсутствии СМФ блокады, что может быть обусловлено активацией макрофагов и их поляризацией. В то же время опухоль В16-F1 не влияла на скорость элиминации частиц из кровотока в отсутствие СМФ блокады.

СМФ блокаду также тестировали на классической модели острого воспаления, индуцированного внутривенным введением ЛПС (5 мг/кг) мышам линии С57В1/6 за 16 ч до эксперимента. Воспаление вызывало 3-кратное увеличение времени полувыведения частиц из кровотока без блокады (рис. 5в). Также воспаление значительно повлияло на эффективность СМФ блокады, которая изменилась с  $4,2 \pm 1,1$  до  $2,8 \pm 0,9$  раза.

### **Разработка блокирующего агента нового поколения**

Магнитные НЧ оксида железа широко используются в качестве тераностических агентов (интегрирующих в себе диагностику и терапию) благодаря их биосовместимости и мультимодальной функциональности, включая неинвазивную визуализацию, адресную доставку и терапию. Поскольку биосовместимость магнитных НЧ оксида железа тесно связана с их безопасными путями метаболизма, продукт биodeградации всех частиц железа – ферригидрит – является подходящим кандидатом на роль биосовместимого блокатора. Ферригидрит повсеместно присутствует в организме в виде НЧ размером 2-8 нм внутри белкового комплекса апоферритина и используется в качестве депо железа. В отличие от многих магнитных НЧ ферригидрит состоит только из трехвалентного железа, ионы которого вызывают гораздо меньший окислительный стресс, чем двухвалентное железо. Кроме того, покрытые полимером частицы ферригидрита не вызывают гемолиза, не влияют на массу мышей, не приводят к повреждению или воспалению внутренних органов при внутривенном введении в дозе до 800 мкмоль Fe на кг массы тела.

Вдохновленные природным ферритином, мы применили НЧ ферригидрита (FH) в качестве блокаторов СМФ. Синтезированные НЧ FH были проанализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 6а). Ядра частиц имели мономодальное распределение со средним диаметром 46 нм (рис. 6б).

Рентгенограмма порошка только что синтезированных частиц (рис. 6в) содержала две широкие полосы при 35 и 63 градусах  $2\theta$ , которые соответствовали 2-линейному ферригидриту ферритинового ядра. Известно, что фаза аморфного ферригидрита обладает низкой химической стабильностью и способностью к трансформации в другие виды оксидов железа. Мы предположили, что такая низкая химическая стабильность

способствует более быстрому гидролизу и метаболизму НЧ FH *in vivo*, что может снизить возможную неблагоприятную токсичность, связанную с длительным воздействием этих частиц на организм.

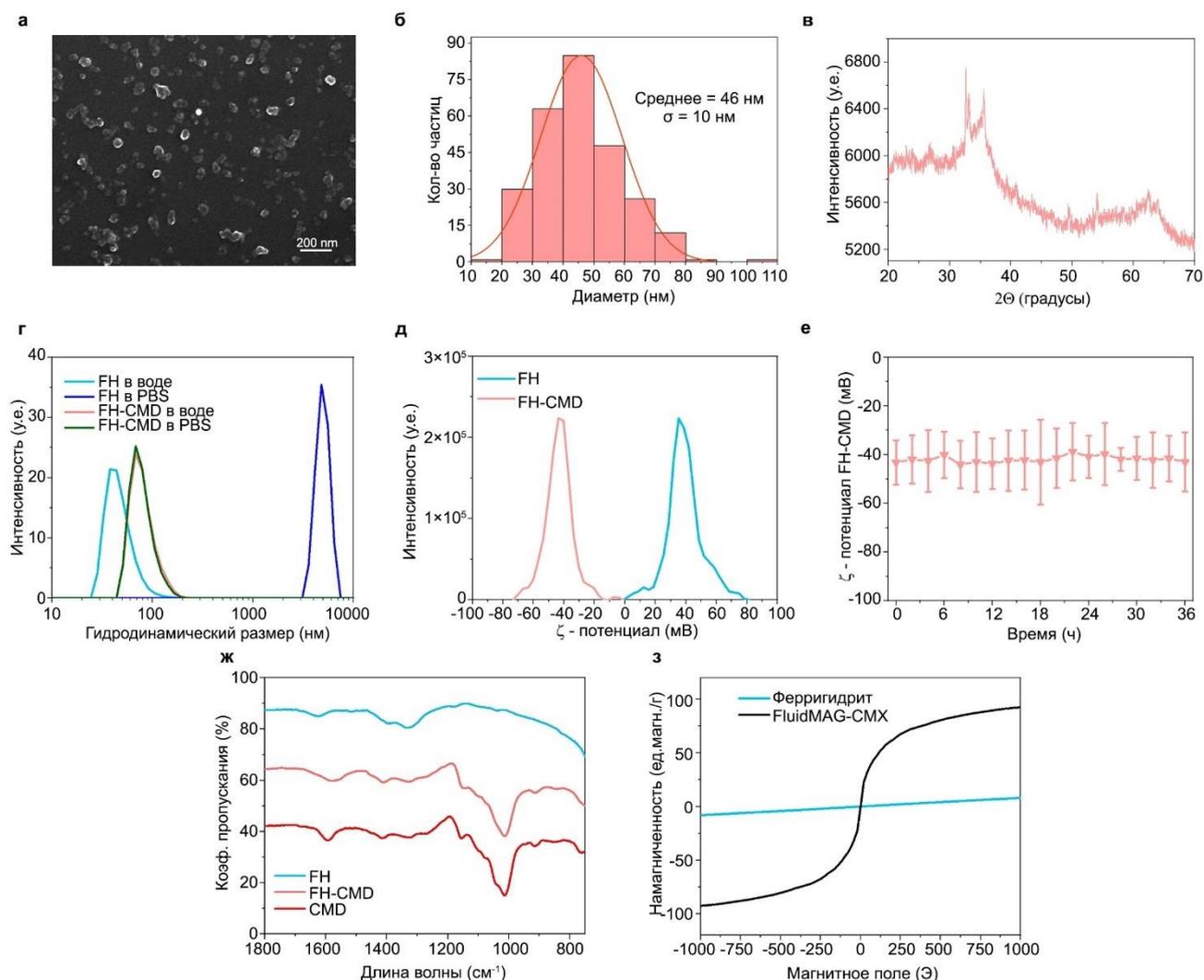


Рисунок 6. Характеризация частиц ферригидрита (FH). (а) СЭМ-изображение синтезированного FH. (б) Распределение размеров ядер FH. (в) Рентгенограмма FH. (г) Распределение гидродинамических размеров частиц FH без покрытия и покрытых карбоксиметил-декстраном (FH-CMD) в воде и PBS. (д) Распределение  $\zeta$ -потенциала FH и FH-CMD. (е) Эволюция  $\zeta$ -потенциала частиц FH-CMD во времени, подтверждающая стабильность их покрытия. (ж) FTIR-спектры непокрытых FH и покрытых CMD. (з) Намагниченность частиц ферригидрита и FluidMAG-CMX, измеренная с помощью СКВИД-магнитометра.

Частицы FH были нековалентно покрыты карбоксиметил-декстраном (CMD) для экспериментов *in vivo*. Полимерное покрытие привело к увеличению гидродинамического размера с 48 до 81 нм (рис. 6г), а средний  $\zeta$ -потенциал уменьшился с +39 до -43 мВ (рис. 6д) из-за анионной природы карбоксиметильных групп CMD. Покрытие оставалось стабильным в течение времени, достаточного для исследования фармакокинетики (рис. 6е).

Это обеспечило коллоидную стабильность FH-CMD в буфере PBS в отличие от FH без покрытия, которые быстро агрегировали, образуя микронные структуры (рис. бг).

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

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

В качестве суперпарамагнитных частиц использовали частицы FluidMAG-CMX (Chemicell), циркуляцию в кровотоке и биораспределение которых исследовали после СМФ блокады. Эти частицы оксида железа, покрытые карбоксиметил-декстраном, имели гидродинамический диаметр  $120\pm 50$  нм и слабоотрицательный  $\zeta$ -потенциал  $-16\pm 7$  мВ. В отличие от FH наночастиц, они проявляли нелинейное суперпарамагнитное поведение (рис. бз), что определило возможность их количественного обнаружения с использованием метода MRQ.

Данный магнитно-спектральный подход применялся для анализа нелинейной намагниченности материалов в ответ на приложенное переменное магнитное поле. Метод нечувствителен к пара- и диамагнетикам, что делает его удобным для обнаружения небольших количеств суперпарамагнитных НЧ в присутствии больших концентраций фонового эндогенного железа. При этом концентрация магнитных НЧ в образцах тканей или крови количественно коррелирует с измеренным магнитным сигналом.

## СМФ блокада ферригидритными наночастицами

Покрытые полимером FH наночастицы использовали для СМФ блокады. Доза 5 мг блокирующих частиц на мышь была выбрана на основании предыдущих исследований СМФ блокады твердыми наноматериалами. Чтобы показать, что FH-CMD НЧ действительно подвергаются поглощению клетками СМФ, мы изучили их биораспределение через 24 часа после внутривенного введения. Ранее было показано, что FH НЧ индуцируют T2-взвешенный контраст, поэтому анализ распределения частиц был выполнен с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) (рис. 7 а, б). Видна усиленная контрастность органов СМФ после введения НЧ: печени, селезенки и костного мозга, что свидетельствует о биораспределении FH.

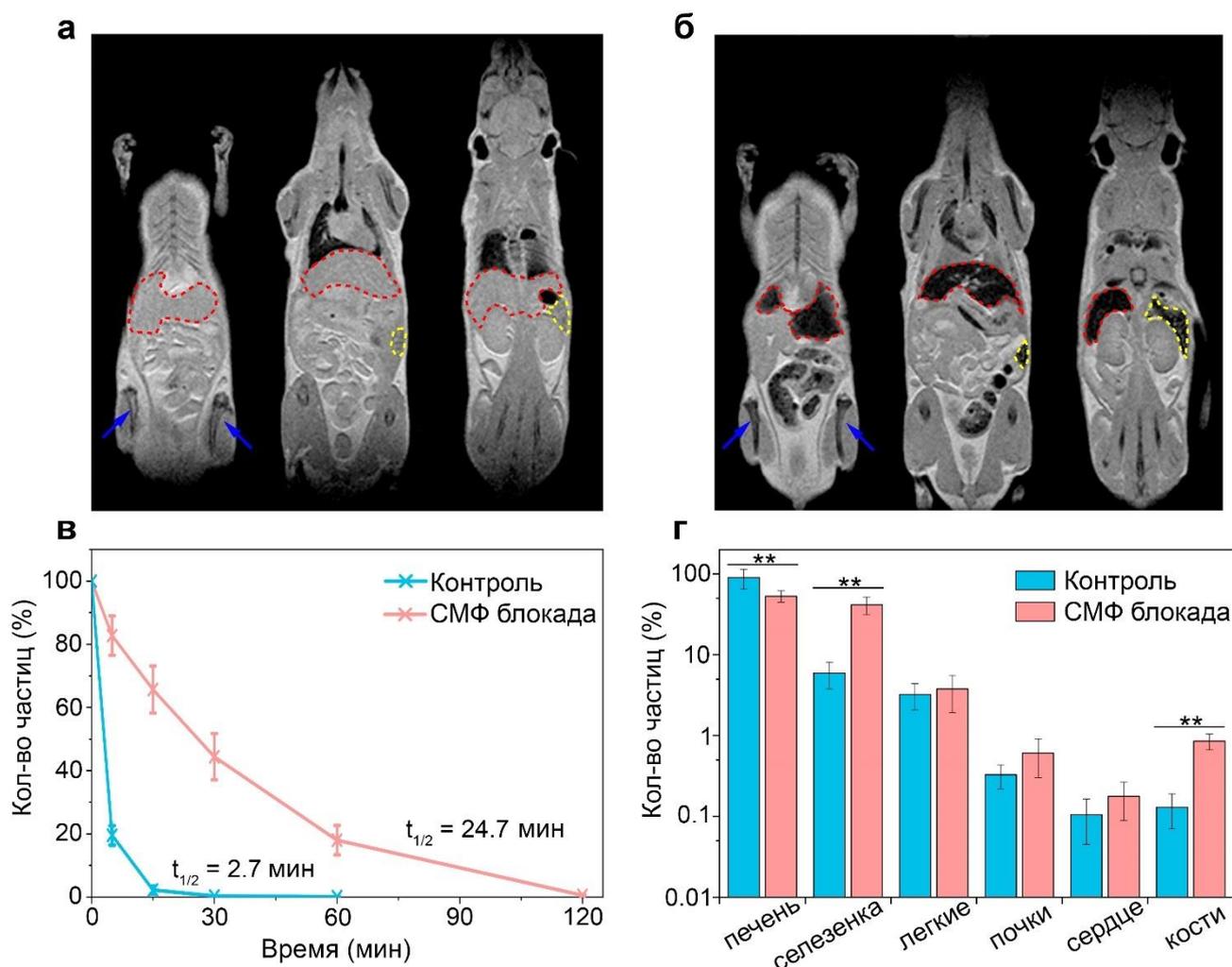


Рисунок 7. СМФ блокада частицами ферригидрита, покрытыми CMD (FH-CMD), у здоровых мышей BALB/c. (а,б) МРТ-изображения мышей без блокады (а) и через 24 ч после (б) СМФ блокады частицами FH-CMD. Печень, селезенка и кости обведены красным, желтым и отмечены синими стрелками соответственно. (в) Кинетика циркуляции частиц FluidMAG-CMX в крови после СМФ блокады и без. (г) Биораспределение частиц FluidMAG-CMX у здоровых мышей BALB/c через 2 часа после введения наночастиц после СМФ блокады и без. \*\* -  $P < 0,01$ , t-критерий Уэлча.

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

В дополнение к фармакокинетическому профилю суперпарамагнитных частиц в кровотоке мы наблюдали эффект СМФ блокады через значительные изменения в биораспределении суперпарамагнитных частиц (рис. 7г). Поглощение частиц FluidMAG-CMX печенью снизилось с 90% введенной дозы (ID) до 53% ID, в то время как в селезенке оно увеличилось с 6% ID до 41% ID. Это перераспределение частиц является репрезентативной демонстрацией неспецифической блокады, когда селезенка берет на себя функцию главного фильтрующего органа. Также в 6 раз увеличилось количество частиц, захваченных в костях (с 0,13% ID до 0,85% ID), в то время как содержание FluidMAG-CMX в остальных органах осталось на прежнем уровне. Этот интересный результат предполагает, что СМФ блокада частицами FH-CMD потенциально может быть использована для улучшения эффективности нанотерапевтических средств, нацеленных на кости.

Затем мы применили СМФ блокаду с помощью FH-CMD НЧ, чтобы улучшить адресную доставку FluidMAG-CMX к опухоли (рис. 8а). С этой целью использовали подкожную модель меланомы B16-F1 у мышей C57Bl/6. Целенаправленную доставку FluidMAG-CMX к опухоли осуществляли путем создания градиента магнитного поля с помощью небольшого NdFeB магнита размером  $1 \times 2 \times 0,5$  см, расположенного вплотную к поверхности опухоли. На рисунке 8а показано отсутствие значительного усиления контраста опухолей после введения только FH-CMD или магнитных FluidMAG-CMX НЧ, что указывает на отсутствие значительного накопления ферригидритных и магнитных частиц в опухоли при их отдельном использовании. Однако после СМФ блокады FluidMAG-CMX эффективно доставлялись к опухоли, что приводило к высококонтрастной визуализации опухоли.

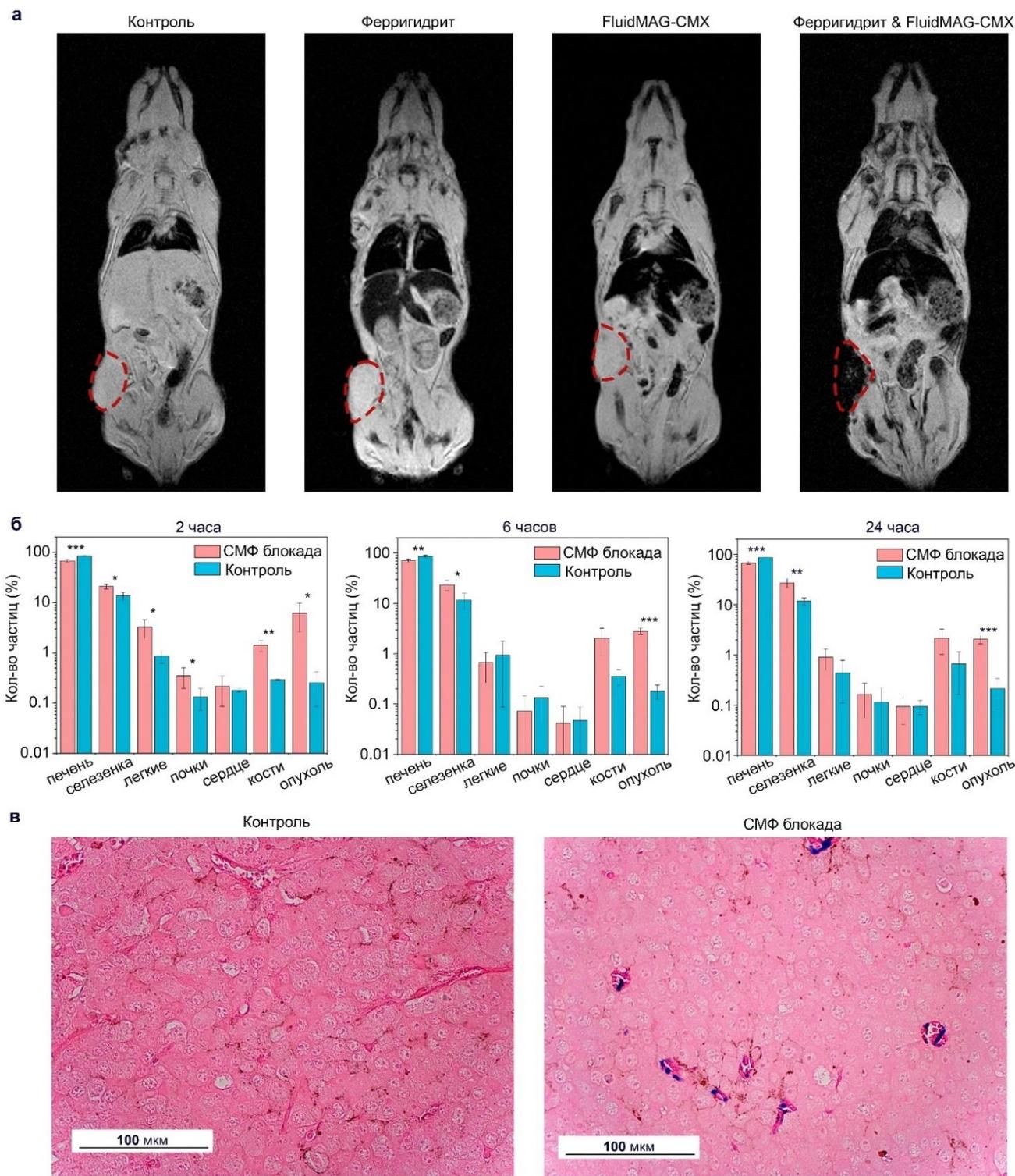


Рисунок 8. СМФ блокада у мышей C57Bl/6 с опухолями B16-F1. (а) Справа налево: МРТ-изображения мышей с опухолями без частиц, через 3 часа после введения частиц FH-CMD, через 2 часа после введения FluidMAG-CMX без СМФ блокады, через 2 часа после введения FluidMAG-CMX после СМФ блокады. Опухоли очерчены пунктирными красными контурами. (б) Биораспределение частиц FluidMAG-CMX через 2, 6 и 24 часа после введения после СМФ блокады и без. (в) Гистологические изображения опухолей через 2 часа после введения частиц FluidMAG-CMX, окрашенные эозином и берлинской лазурью Перлса после СМФ блокады и без. Железо обнаруживается по синему цвету из-за окрашивания берлинской лазурью.

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

Усиление сигнала в легких и почках мышей после СМФ блокады, скорее всего, было связано с тем, что FluidMAG-CMX оставался в кровотоке через 2 ч после инъекции. Этим также можно объяснить усиление сигнала с течением времени исследования в селезенке и костях, где макрофаги селезенки и эндотелиальные клетки костного мозга с фагоэндоцитозной активностью были способны поглощать наночастицы. Напротив, высокая доля ID, оставшаяся в опухоли, в первую очередь была связана с притяжением частиц к магниту, удерживаемому вплотную к опухоли. Удаление магнита через 2 часа привело к вымыванию FluidMAG-CMX, накопленного в микроциркуляторном русле опухоли, и постепенному снижению сигнала в течение следующих 22 часов. Таким образом, временная часть магнитного сигнала опухоли соответствовала захвату FluidMAG-CMX в тканевой микроциркуляторной системе, тогда как стойкий остаточный сигнал предположительно вызван частицами, захваченными клетками стенки кровеносных капилляров и локальными фагоцитами, или соответствует частицам, задержанным в интерстиции после проникновения через стенки капилляров.

Чтобы более детально изучить судьбу FluidMAG-CMX в опухоли, мы провели гистологический анализ собранных опухолей через 2 часа после введения частиц FluidMAG-CMX (рис. 8в). После СМФ блокады опухоли, окрашенные берлинской лазурью по Перлсу, свидетельствовали о накоплении FluidMAG-CMX преимущественно в просвете сосудов, а также в периваскулярных отделах вокруг сосудов микроциркуляторного русла (вероятно, в перипитах). Из-за более развитой сосудистой сети на периферии опухоли концентрация FluidMAG-CMX была значительно выше, чем в ядре опухоли. В зонах кровоизлияний во внеклеточном пространстве также выявляли FluidMAG-CMX. Окрашивание наблюдалось и в клетках воспалительного инфильтрата (вероятно, макрофагах). Как и ожидалось для доставки, опосредованной магнитным полем, FluidMAG-CMX НЧ в основном обнаруживались в кровеносных капиллярах опухоли и в периваскулярных областях и не обнаруживались в опухолевых клетках. Напротив, в отсутствие СМФ блокады FluidMAG-CMX почти не был обнаружен в опухолях мышей.

### **Токсичность высокой дозы ферригидритных частиц**

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

Гистологический анализ с окрашиванием эозином и берлинской лазурью Перлса показал отложение железа на клеточном уровне (рис. 9). Скоплений гемосидерина в сердце и легких не наблюдалось. Вызванный частицами гемосидероз клеток Купфера в печени и макрофагов в селезенке, а также накопление гемосидерина в почках наблюдались через 7 и 30 дней после введения FH-CMD. В селезенке количество железо-положительных клеток увеличилось в течение месяца, в то время как отложение гемосидерина в печени оставалось почти неизменным в течение периода исследования. Это соответствует опубликованным данным о деградации частиц оксида железа, свидетельствующим о перераспределении метаболизированного железа из печени в селезенку. Через 7 дней после введения FH-CMD железо в основном определялось в красной пульпе селезенки. Выявлено повышение уровня гемосидерина в белой пульпе и маргинальной зоне селезенки в течение месяца, что свидетельствует об активном перераспределении форм железа внутри органа за это время.

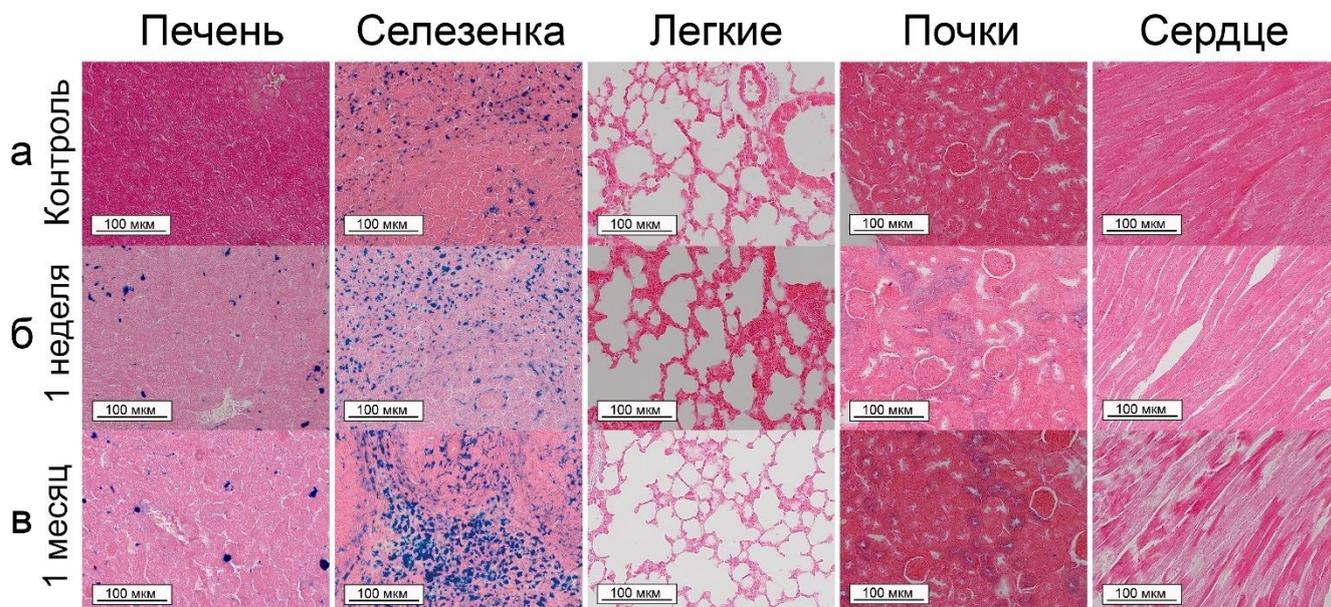


Рисунок 9. Гистологические изображения тканей, окрашенных эозином и берлинской лазурью Перлса. Репрезентативные гистологические изображения печени, селезенки, легких, почек и сердца мышей без СМФ блокады (а), через неделю (б) и через месяц (в) после СМФ блокады. Железо обнаруживается по синему цвету из-за окрашивания берлинской лазурью. Шкала – 100 мкм.

В просветах почечных канальцев и собирательных трубочек НЧ FH-CMD обнаруживали в течение месяца. Однако в клубочках почек FH-CMD были выявлены через неделю после инъекции, но полностью отсутствовали через месяц. FH-CMD фильтровались в клубочках, а в эпителии канальцев наблюдались зернистые отложения, что указывало на небольшое поглощение FH-CMD канальцевым эпителием. Отложение железа в почечных канальцах и собирательных трубочках свидетельствует о возможном участии почечного клиренса в метаболизме железа. Обычно НЧ выводятся почками, если они меньше 5,5 нм. Это свидетельствует о биodeградации НЧ FH-CMD в организме, поскольку после синтеза мы не наблюдали частиц с ядрами <math><10\text{ нм}</math> (рис. 6б).

Затем мы исследовали влияние FH-CMD НЧ на органы с высоким поглощением блокирующих частиц или их метаболитов: печень, селезенку, кости и почки. На рис. 10а представлены биохимические показатели крови, такие как аспаратаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), мочевины и креатинина. Результаты этого исследования показали, что активность ЛДГ, АЛТ и АСТ была повышена по сравнению с контрольными значениями на 1-й день после введения частиц FH-CMD (рис. 10а), что указывает на стресс клеток печени, в то время как активность ЩФ, уровни мочевины и креатинина были в пределах нормы, что указывает на отсутствие повреждения костей и почек. На 3-и и 7-е сутки после введения все исследуемые биохимические показатели не отличались от контрольных показателей.

Также небольшая аномалия была обнаружена по временному и незначительному снижению веса мышей на 4% на 2-й день, которое, однако, восстановилось уже к 3-му дню (рис. 10б).

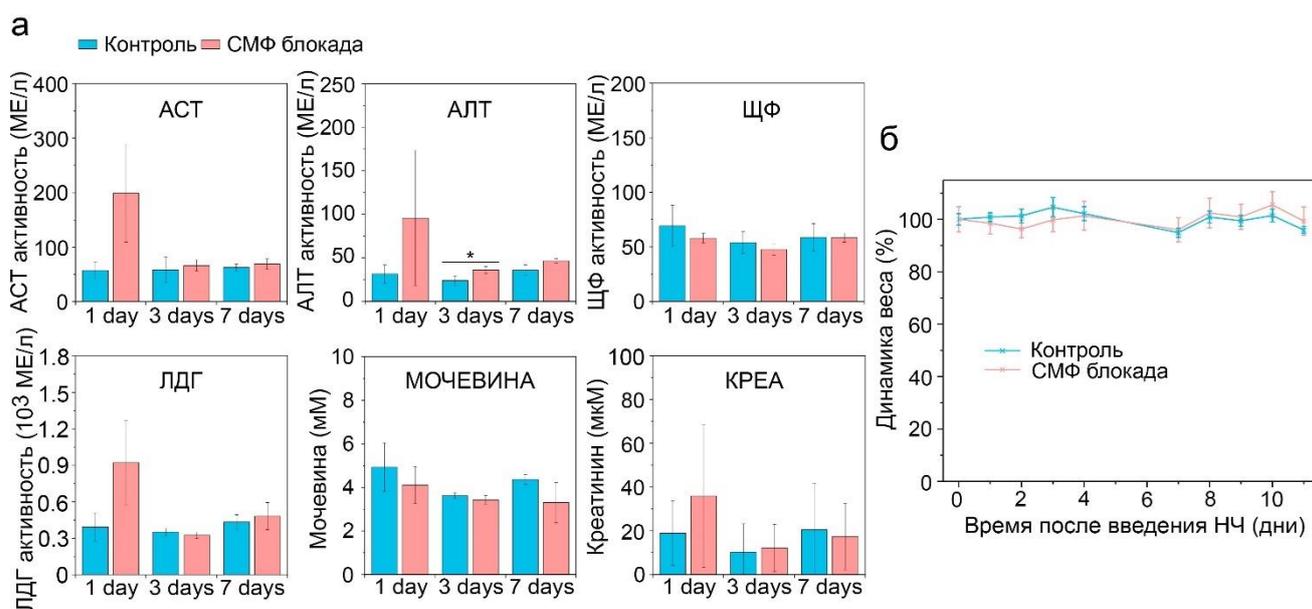


Рисунок 10. Токсичность 5-мг дозы частиц FH-CMD. (а) Биохимический анализ крови после СМФ блокады: аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), мочевины (МОЧЕВИНА) и креатинина (КРЕА). (б) Динамика веса мышей с СМФ блокадой и без нее. \* -  $P < 0,05$ , t-критерий Уэлча.

### Заключение

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

Кроме того, был разработан новый биосовместимый агент, пригодный для блокады системы мононуклеарных фагоцитов – наночастицы ферригидрита (FH), имитирующие эндогенное железо, связанное с ферритином. В работе был продемонстрирован простой синтез FH, покрытого карбоксиметил-декстраном (CMD), который был применен для повышения эффективности адресной доставки нанолекарств в опухоль, управляемой магнитным полем. В результате адресная доставка суперпарамагнитных наночастиц, введенных через 1 час после инъекции наночастиц FH-CMD, увеличилась в 24 раза по

сравнению с контролем. При этом НЧ FH-CMD поглощались в основном печенью и селезенкой и обладали достаточно низкой токсичностью. Полученные результаты демонстрируют, что подсказанные природой НЧ ферригидрита представляют собой почти оптимальный наноматериал для высокоэффективной блокады СМФ с практически незначительными побочными эффектами.

### **Выводы**

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

### **Апробация результатов**

Основные результаты диссертации были представлены на конференциях: Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2017» (Москва, Россия, 2017); The 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> International Symposium and School for Young Scientists on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine (Москва, Россия, 2019-2021); 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Копенгаген, Дания, 2018); XXX, XXXII-XXXIV Международная зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», (Москва, Россия, 2018, 2020-2022); 60, 62 и 63-я Всероссийская научная конференция МФТИ (Долгопрудный, Россия, 2017, 2019, 2020); Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2018); Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, Россия, 2018). По материалам работы было опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах и 14 тезисов конференций.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Nikitin P.I., Nikitin M.P., Deyev S.M. In vivo blockade of mononuclear phagocyte system with solid nanoparticles: Efficiency and affecting factors. *Journal of Controlled Release*. 2021. T. 330. C.111-118.
2. Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Ivanov I.N., Belyaev I.B., Dzhililova D.S., Trushina D.B., Yaremenko A.V., Ivanov V.Y., Nikitin M.P., Nikitin P.I., Zvyagin A.V., Deyev S.M. Macrophage Blockade using Nature-Inspired Ferrihydrite for Enhanced Nanoparticle Delivery to Tumor. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022. T. 621. C.121795.
3. Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Mirkasymov A.B., Nikitin P.I., Nikitin M.P., Deyev S.M. Synthesis and Characterization of hybrid core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles for biomedical applications. *Acta Naturae* (англоязычная версия). 2017. T. 9.4 (34). C.58-65.

Тезисы конференций:

1. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Влияние размера частиц на эффективность блокировки системы мононуклеарных фагоцитов. Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2017». 10-14 апреля 2017 (стр. 1).
2. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Влияние покрытия частиц и их размера на эффективность блокировки системы мононуклеарных фагоцитов. 60-я Всероссийская научная конференция МФТИ. 20-26 ноября 2017 (стр. 7-8).
3. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Изучение блокировки системы мононуклеарных фагоцитов, вызываемой поглощением высоких доз наночастиц. XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 12-15 февраля 2018 (стр. 92-93).
4. A.B. Mirkasymov, I.V. Zelepukin, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin, S.M. Deyev. Mononuclear phagocyte system blockade, caused by the uptake of magnetic nanoparticles. 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. 2018 May 22-26 (p. 72).
5. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Исследование параметров, влияющих на эффективность блокировки системы мононуклеарных фагоцитов. Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 23-25 мая 2018 (стр. 254-255).
6. Миркасымов А.Б., Зелепукин И.В., Никитин М.П., Никитин П.И., Деев С.М. Блокировка системы мононуклеарных фагоцитов, вызываемая поглощением магнитных наночастиц. Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии». 27-30 ноября 2018 (стр. 127-128).
7. A. Mirkasymov, I. Zelepukin, P. Nikitin, M. Nikitin, S. Deyev. Prolongation of nanoparticles blood circulation via macrophage inhibition. IV International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine». 2019 October 26-30 (pp. 182-183).
8. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Продление циркуляции наночастиц в кровотоке посредством ингибирования способности макрофагов к фагоцитозу. 62-я Всероссийская научная конференция МФТИ. 18-24 ноября 2019 (стр. 48).
9. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, П.И. Никитин, М.П. Никитин, С.М. Деев. Блокировка макрофагов наноматериалами улучшает фармакокинетику наночастиц. XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 10-13 февраля 2020 (стр. 21).

10. A. Mirkasymov, I. Zelepukin, P. Nikitin, M. Nikitin, S. Deyev. Mononuclear phagocyte system blockade by nanoagents in various in vivo models. V International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine». 2020 November 7-11 (стр. 126-127).
11. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, П.И. Никитин, М.П. Никитин, С.М. Деев. Блокировка макрофагов наночастицами in vivo в различных иммунных состояниях. 63-я Всероссийская научная конференция МФТИ. 23-29 ноября 2020 (стр. 80-81).
12. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, П.И. Никитин, М.П. Никитин, С.М. Деев. Блокировка системы мононуклеарных фагоцитов наноагентами в различных иммунных состояниях. XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2021 (стр. 157).
13. A. Mirkasymov, I. Zelepukin, I. Belyaev, I. Ivanov, A. Zvyagin, S. Deyev. FERRIHYDRITE MEDIATED MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM BLOCKADE FOR IMPROVED TUMOR TARGETING OF NANOMATERIALS. The 6-th International Symposium and Schools for Young Scientists on Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine. 2021 November 20-24 (стр. 182-183).
14. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, И.Н. Иванов, Д.Ш. Джалилова, С.М. Деев. Блокада системы мононуклеарных фагоцитов наночастицами ферригидрита для улучшения доставки наноагентов в опухоль. XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2022 (стр. 145).

### **Благодарности**

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