

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК: 577.1:615

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ МАГНИТНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ

*, **, **** В.К. Хлебников, магистрант, **, ***, **** Х.М. Вишвасрао, аспирант, **, ***, **** М.А. Сокольская, научный сотрудник, **, ***, **** А.В. Кабанов, директор

* кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

** Центр по доставке лекарств и наномедицине, Медицинский центр университета Небраски (США)

*** Лаборатория «Химический дизайн бионаноматериалов»,

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

**** Университет Лилль 1 – Науки и Технологии (Франция)

e-mail: vkhlebnikov@yahoo.com

М агнитные наночастицы (МНЧ), полученные двумя методами: термическим разложением пентакарбонила железа(0) и методом полиольного синтеза, были охарактеризованы с использованием динамического/электрофоретического светорассеивания (ДСР/ЭСР) и просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМ). Полученные МНЧ были опробованы как потенциальные агенты для магнитной гипертермии путем измерения их способности вызывать нагрев водной дисперсии в переменном электромагнитном поле.

Magnetic nanoparticles (MNPs) obtained by two methods – thermal decomposition of iron(V) pentacarbonyl and polyol synthesis – were characterized with the use of dynamic/electrophoretic light scattering and high resolution transmission electron microscopy. The obtained MNPs were tested as potential agents for magnetic hyperthermia by measuring their ability to cause water dispersion heating in an electromagnetic field.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, магнитная гипертермия.

Key words: magnetic nanoparticles, magnetic hyperthermia.

Магнитные наночастицы (МНЧ) обладают способностью ответа на внешнее магнитное поле, благодаря чему они активно изучаются для разделения биологических молекул [1], в качестве меток клеток [2], а также как системы направленной доставки лекарств [3]. Более того, способность МНЧ преобразовывать энергию переменного магнитного поля в тепло может быть использована для индуцированного высвобождения лекарств [3] и для гипертермии злокачественных новообразований [4]. Наконец, МНЧ могут быть использованы как контрастирующие агенты для диагностического применения, например, для магнитно-резонансной томографии [5].

Цель данной работы – получение магнитных наночастиц Fe_2O_3 (МНЧ0) и Fe_3O_4 (МНЧ1) с различной кристаллической структурой и опробование их в качестве агентов для магнитной гипертермии.

Экспериментальная часть

Все реагенты и растворители приобретены в фирме Sigma-Aldrich (США). Растворители применяли без дополнительной очистки.

Синтез магнитных наночастиц Fe_2O_3 (МНЧ0). Смесь октилового эфира (10 мл, 90%) и олеиновой кислоты (1.28 г, 4.56 ммоль, 99%) нагревали в трехгорлой колбе до 100°C с последующим добавлением пентакарбонила железа(0) (0.34 г, 4.56 ммоль, 99%). Результирующую смесь нагревали до кипения и оставляли на магнитной мешалке на 1 ч для образования

олеатного комплекса. В течение этого времени изначально оранжевый раствор постепенно становился черным. После охлаждения до комнатной температуры в колбу добавляли безводный триметиламин N-оксид (0.34 г, 4.56 ммоль, 98%). Смесь вновь нагревали до 133°C в атмосфере азота. Указанную температуру поддерживали в течение 2 ч; при этом раствор приобретал коричневую окраску. Далее температуру реакционной смеси поднимали до температуры кипения и поддерживали ее в течение 1 ч; раствор постепенно становился черным. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры с последующим добавлением этанола (70%). При этом осаждались гидрофобные магнитные наночастицы, которые отделяли от раствора центрифугированием. Процедуру осаждения/суспендирования в этаноле повторяли три раза до полного отделения от непрореагировавшей олеиновой кислоты с последующим суспендированием частиц в тетрагидрофуране (ТГФ, 99.9%).

Синтез магнитных наночастиц Fe_3O_4 (МНЧ1). Ацетилацетонат Fe(III) (0.7 г, 2 ммоль, 99%) в 25 мл триэтиленгликоля (99%) нагревали до 180°C в атмосфере N_2 , и указанную температуру поддерживали в течение 30 мин. Затем температуру смеси быстро поднимали до температуры кипения, и оставляли смесь перемешиваться на 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры магнитные наночастицы осаждали добавлением этилацетата (99.8%) и отделяли с помощью магнита. Процедуру осаждения/суспендирования в этилацетате пов-

ториями три раза с целью отделения МНЧ от избытка триэтиленгликоля с последующим суспендированием частиц в воде. После обработки ультразвуком дисперсию наночастиц отфильтровывали через фильтр Millex (размер пор 200 нм) для избавления от возможных агрегатов.

Перевод МНЧО в воду. Раствор полиакриловой кислоты (ПААК, степень полимеризации 150) объемом 0.4 мл (10% по массе) добавляли к 4 мл дисперсии МНЧО в ТГФ (4 мг/мл). Дисперсию обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин с последующим разбавлением 4 мл дистиллированной воды и еще раз подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 мин. ТГФ удаляли на роторном испарителе. После обработки ультразвуком дисперсию отфильтровывали через фильтр Millex (размер пор 200 нм) для избавления от возможных агрегатов.

Определение количества свободных карбоксильных групп на поверхности МНЧО.

В основе лежит метод, используемый для количественного определения карбоксильных групп в целлюлозе [6]. Дисперсию МНЧО (100 мкл, 1 мг/мл) разбавляли 0.1 М раствором NaOH до объема 4.25 мл с последующим добавлением 10 мкл 0.01 мг/мл метилена синего (МС, 82%). Полученный раствор в течение 2 ч перемешивали при комнатной температуре. МНЧО с адсорбированным на них МС отделяли от неадсорбированного МС ультрацентрифугированием (90000 g) в течение 1 ч. Количество свободных карбоксильных групп ПААК определяли по формуле:

$$X^{COOH}_{MNCH0} = (A - B) / (373.9 \cdot C) \quad (1)$$

где A – общая масса МС (10^{-5} г);
 B – масса МС в супернатанте (г);
 C – масса МНЧО (10^{-4} г).

Неизвестную величину B находили спектрофотометрически по формуле Ламберта-Бера:

$$D = [MC] \cdot \varepsilon \cdot l = \frac{B}{M \cdot V}, \text{ откуда} \quad (2)$$

$$B = \frac{(D \cdot M \cdot V)}{(\varepsilon \cdot l)},$$

где D – оптическая плотность; $[MC]$ – концентрация МС супернатанте ($\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$); ε – молярный коэффициент экстинкции ($73044 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при 668 нм [7]); l – длина оптического пути (1 см); M – молекулярная масса МС ($373.9 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$); V – объем супернатанта (4.26 мл).

Таким образом, при $D = 0.007$, $B = 1.345 \cdot 10^{-7}$ г по формуле (1) находим:

$$X^{COOH}_{MNCH0} = 3.129 \cdot 10^{-7} \text{ моль/г.}$$

Морфологию и размер частиц изучали с помощью ПЭМ высокого разрешения (410LS; Phillips, FEI Co., Hillsboro, OR) с негативным контрастированием уранил ацетатом при ускоряющем напряжении 80 кВ. Гидродинамичес-

кий диаметр и дзета-потенциал магнитных наночастиц определяли методами ДСР/ЭСР, используя Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Все измерения проводили в одноразовой полистирольной кювете в автоматическом режиме при 25°C, угол рассеивания 173°. Программное обеспечение, поставляемое с Zetasizer Nano ZS, использовали для расчета среднего размера, полидисперсности и дзета-потенциала наночастиц. Представленные данные являются средним арифметическим трех последовательных измерений. Измерения способности полученных магнитных наночастиц нагревать водную дисперсию под действием переменного электромагнитного поля проводили с использованием установки EASYHEAT 2 кВ (Ambrell, США) при следующих параметрах: 220 А и 336 кГц, электромагнитное поле около 28 кАм⁻¹.

Результаты и их обсуждение

Магнитные наночастицы с различной кристаллической структурой Fe₂O₃ (МНЧ0) и Fe₃O₄ (МНЧ1), используемые в данной работе, получали методами термического разложения пентакарбонила железа(0) [8] и полиольного синтеза [9], соответственно. На рис. 1 (слева) и на рис. 2 приведены электронные микрофотографии полученных МНЧ0 и МНЧ1.

Существенным недостатком получения МНЧ0 посредством термического разложения пентакарбонила железа(0) является необходимость использования неполярной среды и стабилизации частиц с помощью олеиновой кислоты, которая гидрофобизует их поверхность. Для медицинского применения наночастицы должны находиться в водной среде, поэтому МНЧ0 переводили из ТГФ в воду с помощью ПААК. ПААК содержит большое количество карбоксильных групп, поэтому она должна иметь более высокое сродство к поверхности МНЧ0 по сравнению с олеиновой кислотой, имеющей только одну карбоксильную группу. Процедуру обмена лигандов выполняли под действием ультразвука.

На рис. 1 (справа) приведена электронная микрофотография МНЧ0 после перевода частиц в воду. Видно, что размер и морфология частиц Fe₂O₃ практически не изменились. В частности, согласно данным ПЭМ, диаметр зёрен Fe₂O₃ до и после перевода из ТГФ в воду находится в интервале 4.9–6.5 нм. Однако перевод МНЧ0 в воду путем замещения олеиновой кислоты полиакриловой кислотой привело к существенному увеличению гидродинамического диаметра частиц (определен методом ДСР) от 45 нм (показатель полидисперсности 0.245) до 306 нм (показатель полидисперсности 0.175). Такое значительное расхождение в диаметре частиц,

полученное различными методами, указывает на агрегацию многих более мелких зерен Fe_2O_3 и в ТГФ, и в воде. Кроме того, МНЧ0, стабилизированные ПААК в водной среде, значительно крупнее, чем МНЧ0, стабилизированные олеино-

вой кислотой в ТГФ. Необходимо отметить, что в водной среде МНЧ0 сильно отрицательно заряжены (дзета-потенциал -57.4 мВ), очевидно, за счет присутствия ионизированных карбоксильных групп ПААК.

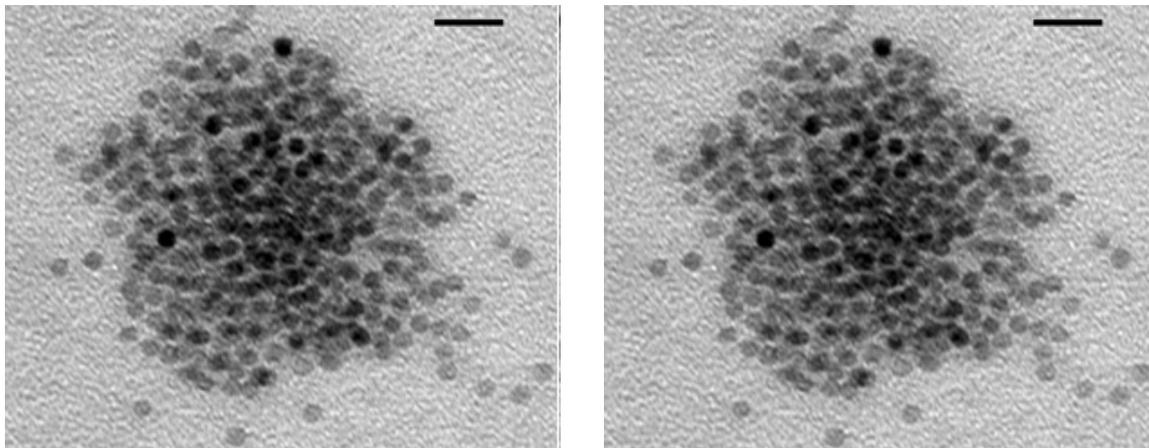


Рис. 1. Электронные микрофотографии магнитных наночастиц: МНЧ0 в ТГФ (слева) и МНЧ0 в воде (справа) после переноса в воду с помощью ПААК. Масштабный отрезок 20 нм.

Вторым типом магнитных наночастиц, исследуемых в данной работе, явились МНЧ1, полученные методом полиольного синтеза в полярной среде триэтиленгликоля. Такие частицы гидрофильны и легко диспергируются в воде, вероятно, из-за адсорбции молекул триэтиленгликоля на их поверхности. По данным ТЕМ, диаметр зерен Fe_3O_4 в таких частицах составлял $7.8-10.5$ нм, а по данным ДСР их средний гидродинамический диаметр 166 нм (показатель полидисперсности 0.187). Таким образом, эти частицы в водной среде тоже представляли собой агрегаты зерен Fe_3O_4 . Они также сильно отрицательно заряжены (дзета-потенциал -55 мВ), что, вероятно, способствовало их стабилизации в водной среде.

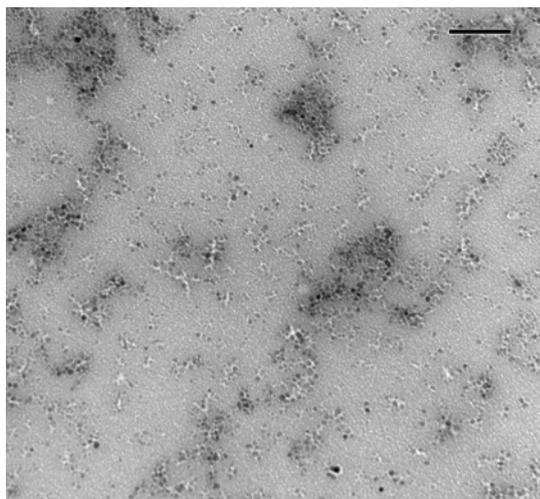


Рис. 2. Электронная микрофотография МНЧ1 в воде. Масштабный отрезок 100 нм.

Способность суперпарамагнитных наночастиц Fe_2O_3 и Fe_3O_4 производить тепло при воздействии переменного электромагнитного

поля может найти применение как альтернатива существующим методам лечения рака. Раковые клетки способны захватывать такие наночастицы. Последующее применение внешнего электромагнитного поля должно приводить к разогреву клеток за счет захваченных наночастиц, а это, в свою очередь, может активировать в таких клетках биохимические процессы, приводящие к их гибели. Такой подход получил название «магнитной гипертермии». Существенно, что магнитная гипертермия – это неинвазивный метод, который может быть совмещен с неинвазивной визуализацией, например, с помощью метода магнитной резонансной томографии (МРТ). Таким образом, после введения частиц в организм можно было бы проследить за их накоплением в опухоли, а затем активировать их в нужный момент для ее уничтожения.

В этой связи мы определяли способность полученных магнитных наночастиц МНЧ0 и МНЧ1 преобразовывать энергию переменного электромагнитного поля в тепло. На рис. 3 приведены графики зависимости температуры дисперсий магнитных наночастиц от времени экспозиции в присутствии переменного электромагнитного поля с характеристиками 220 А и 336 кГц.

Сопоставление приведенных на рис. 3 графиков показывает, что скорость нагрева дисперсии МНЧ1 (Fe_3O_4) несколько выше, чем МНЧ0 (Fe_2O_3) при равной (1 мг/мл) концентрации частиц в воде и одинаковых параметрах внешнего переменного электромагнитного поля. Дисперсия частиц МНЧ0 достигает температуры $40^\circ C$ за 60 мин, в то время как дисперсии частиц МНЧ1 требуется 50 мин для достижения

той же температуры. Наиболее вероятным объяснением такого различия в скоростях нагрева является разный химический состав, а также размер суперпарамагнитных зёрен Fe_2O_3 и Fe_3O_4 , а также всех частиц МНЧ0 и МНЧ1. Указанные факторы должны играть роль в их способности производить тепло в ответ на переменное электромагнитное поле [10, 11]. Для гипертермии необходимо, чтобы место локализации опухоли было нагрето до температуры 41–47°C, таким образом, полученные результаты можно считать начальной точкой для дальнейшей работы, поскольку эксперименты проводили при магнитном поле приблизительно 28 кАм^{-1} , что выше рекомендуемого безопасного верх-

него значения для гипер-термии опухолей мозга 10 кАм^{-1} [11]. Вместе с тем, при оценке результата следует учитывать, что распространение тепла и локальный нагрев в клеточном окружении может существенно отличаться от условий настоящего эксперимента. Кроме того, начальная температура в организме (37°C) значительно выше комнатной температуры, использованной в условиях эксперимента. Наконец, концентрация наночастиц в среде должна существенно влиять на нагрев, и поэтому дальнейшие исследования должны сосредоточиться на изучении нагрева в клеточных средах и на анализе концентрационной зависимости нагрева в них.

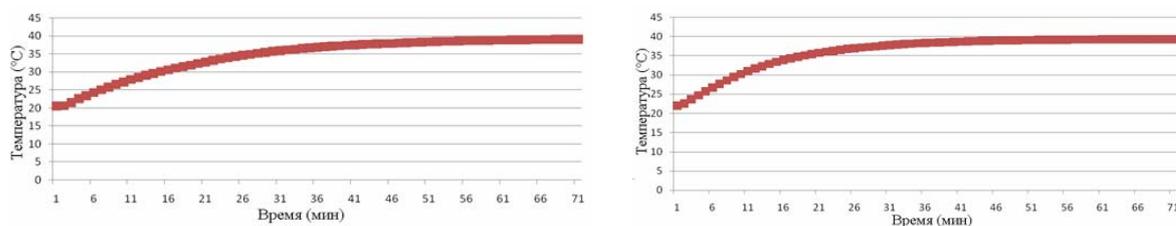


Рис. 3. Зависимость температуры дисперсий магнитных наночастиц от времени экспозиции переменному магнитному полю при 220 А, 336 кГц (магнитное поле 28 кАм^{-1}) для МНЧ0 (5 мг/мл, слева) и МНЧ1 (5 мг/мл, справа).

В экспериментах, описанных выше, как контроль при тех же параметрах электромагнитного поля использовали дистиллированную воду. Примечательно, что температура воды в отсутствие частиц за время измерения 70 мин достигла 34°C, что, вероятно, вызвано теплопереносом вследствие нагревания спирального элемента. Нагревание медной спирали, в центре которой помещается нагреваемый образец, является одной из главных проблем в инструментах, предназначенных для нагревания посредством электромагнитного поля [12]. Данное обстоятельство необходимо принимать во внимание и, по возможности, минимизировать изменением силы тока, проходящего через спираль, и/или использованием дополнительных систем охлаждения.

Гипертермия злокачественных опухолей может сочетаться с традиционными методами, например, химиотерапией [13]. Химиотерапевтические субстанции могут быть ковалентно присоединены к различным функциональным группам на поверхности частиц, среди которых карбоксильные – наиболее часто используемые, поэтому представлялось целесообразным определить количество карбоксильных групп на поверхности МНЧ0: количество свободных

карбоксильных групп на МНЧ0, определенное по адсорбции метилена синего, равно $3.129 \cdot 10^{-7}$ моль/г.

Выводы

Два вида магнитных наночастиц Fe_2O_3 и Fe_3O_4 , имеющие диаметры суперпарамагнитных зёрен 4.9–6.5 и 7.8–10.5 нм, соответственно, опробованы в качестве агентов для гипертермии. Показано, что в переменном электромагнитном поле (220 А и 336 кГц, около 28 кАм^{-1}) дисперсия частиц первого типа (Fe_2O_3) достигает температуры 40°C за 60 мин, в то время как дисперсия частиц второго типа (Fe_3O_4) той же концентрации достигает этой температуры за 50 мин. Дистиллированная вода, используемая как контроль, нагревается в существенно меньшей степени и достигает температуры 34°C за 70 мин. Определено количество свободных карбоксильных групп на поверхности частиц МНЧ0: $3.129 \cdot 10^{-7}$ моль/г.

Работа выполнена при поддержке Национального фонда здоровья США за счет финансирования Центра превосходства биомедицинских исследований «Центра наномедицины Небраски» (грант NIH COBRE 1P20RR021937).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Zhen L., Meng L., Xinjian Y., Meili Y., Jinsong R., Xiaogang Q. The use of multifunctional magnetic mesoporous core/shell heteronanostructures in a biomolecule separation system // *J. Biomaterials*. 2011. V. 32. № 21. P. 4683–4690.
2. Gupta R., Bajpai A. Magnetically guided release of ciprofloxacin from superparamagnetic polymer nanocomposites // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2011. V. 22. № 7. P. 893–918.
3. Hergt R., Hiergeist R., Hilger I., Kaiser W. A., Lapatnikov Y., Margel S., Richter U. Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia // *J. Magnetism & Magnetic Materials*. 2003. V. 270. № 3. P. 345–357.
4. Haacke E.M., Cheng Norman Y.C., House M., Liu Q., Neelavalli J., Ogg R. J., Khan A., Ayaz M., Kirsch W., Obenaus A. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging // *J. Magnetic Resonance Imaging*. 2005. V. 23. № 1. P. 1–25.
5. Fras L., Stana-Kleinschek K., Ribitsch V., Sfiligoj-Smole M., Kreze T. Quantitative determination of carboxylic groups in cellulose by complexometric titration // *J. Lenzinger Berichte*. 2005. V. 81. P. 80–88.
6. Park J., Lee E., Hwang N., Kang M., Kim S., Hwang Y., Park J., Noh H., Kim J., Park J., Hyeon T. One-nanometer-scale size-controlled synthesis of monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles // *J. Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. V. 44. № 19. P. 2872–2877.
7. Cai W., Wan J. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols // *J. Colloid & Interface Sci.* 2007. V. 305. № 2. P. 366–370.
8. <http://omlc.ogi.edu/spectra/mb/index.html>
9. Gonzales-Weimuller M., Zeisberger M., Krishnan K. M. Size-dependant heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia // *J. Magnetism & Magnetic Materials*. 2009. V. 321. № 13. P. 1947–1950.
10. Purushotham S., Ramanujan R. V. Modeling the performance of magnetic nanoparticles in multimodal cancer therapy // *J. Appl. Physics*. 2010. № 107. P. 113701–113709.
11. Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Veverka P., Goglio G., Demourgues A., Portier J., Pollert E., Duguet E. Magnetic nanoparticle design for medical applications // *J. Progress in Solid State Chemistry*. 2006. V. 34. № 2-4. P. 237–247.
12. Spratt J. S., Adcock R. A., Muskovin M., Sherrill W., McKeown J. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy // *J. Cancer Res.* 1980. № 40. P. 256.