

## ПОЛУЧЕНИЕ, МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНЫЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОНЬЮГАТА НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА И ДОКСОРУБИЦИНА

© 2016 г. А.Г. Акопджанов\*, Н.Л. Шимановский\*, Т.А. Федотчева\* \*\*,  
В.К. Имшенник\*\*\*, Ю.В. Максимов\*\*\*, С.В. Новичихин\*\*\*

\*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
117997, Москва, ул. Островитянова, 1;

\*\*Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений, 117216, Москва, ул. Грина, 7;

\*\*\*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: artura777@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.16 г.

После доработки 06.07.16 г.

Рассмотрены возможности повышения эффективности действия противоопухолевого препарата доксорубин с помощью сверхмалых магнитных наночастиц сложного оксида железа. Предложена методика связывания молекул доксорубина и магнитных наночастиц с помощью лимонной кислоты. У полученных конъюгатов методами протонной релаксометрии и мессбаэуровской спектроскопии исследованы основные магнитные свойства, а с помощью спектрофотометрического МТТ-теста на культуре клеток HeLa оценена их цитотоксическая активность. Показано, что конъюгаты на основе наночастиц магнетита и доксорубина обладают высокой магнитно-резонансной контрастирующей способностью. Магнитные свойства наночастиц магнетита в свободном и связанном состоянии слабо зависят от состава стабилизирующей оболочки и определяются средним размером нанообъектов и фазовым составом. Синтезированные конъюгаты на основе наночастиц магнетита и доксорубина превосходят по цитотоксическому действию свободный доксорубин, что дает возможность усилить противоопухолевое действие доксорубина и контролировать динамику его доставки в очаг заболевания за счет магнитных контрастных свойств наночастиц.

*Ключевые слова:* наночастицы оксида железа, магнетит, доксорубин, протонная релаксометрия, мессбаэуровская спектроскопия.

Магнитные наночастицы являются одним из самых перспективных наноматериалов для использования в медицине [1]. В настоящее время ведется поиск возможностей повышения эффективности действия противоопухолевых препаратов, в частности доксорубина, с помощью суперпарамагнитных наночастиц магнетита. Существуют публикации, свидетельствующие о возможностях адресной доставки, снижения побочных эффектов, а в некоторых случаях и увеличения цитостатических свойств при применении конъюгатов наночастиц с доксорубином [2].

Одним из известных преимуществ применения наночастиц магнетита, нагруженных доксорубином, является возможность контроля доставки конъюгата в очаг заболевания за счет магнитно-резонансных контрастных свойств наночастиц. Исследования показали, что основным фактором, определяющим контрастирующую способность, является размер наночасти-

цы, как основы конъюгата, а также ее кристаллическая однородность [3].

В общем случае данные параметры определяются выбором режимов химического синтеза наночастиц магнетита, а также выбором стабилизаторов. При этом до настоящего времени не было известно, как включение доксорубина в процесс синтеза наночастиц магнетита влияет на их магнитные характеристики, которые важны для возможности использования этих частиц одновременно для контрастирования очага поражения. Данная работа посвящена исследованию магнитных и магнитно-резонансных свойств конъюгата наночастиц магнетита и доксорубина.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основным объектом исследований были приготовленные наночастицы магнетита, стабилизированные лимонной кислотой по мето-

дике, описанной авторами ранее [4,5]. В качестве исходного препарата для синтеза конъюгатов использовали Доксорубин–Эбеве (водный раствор, концентрация 2 мг/мл).

Методика синтеза наночастиц, нагруженных молекулами доксорубина, основана на возможности образования связей между относительно отрицательно заряженной лимонной кислотой, покрывающей в качестве стабилизатора поверхность сверхмалой наночастицы, и относительно положительно заряженной молекулой доксорубина [6]. При попадании конъюгата в слабую кислотную среду происходит высвобождение доксорубина (примерно 40%) до установления нового равновесия [7].

По сравнению с синтезом свободных наночастиц, нагруженных доксорубином, проводили в два этапа. На первом этапе осуществляли образование зародышей наночастиц из смеси солей водным раствором аммиака и стабилизацией лимонной кислотой с доведением до pH 4,7 (значения, соответствующего pH исходного раствора доксорубина). Раствор тщательно перемешивали в течение 7 ч и выстаивали в течение 12 ч с целью формирования осадка из крупной фракции наночастиц. На втором этапе осадок удаляли и pH конечного раствора доводили до физиологически приемлемого значения 6,3 [5]. С целью повышения вероятности связывания наночастицы и доксорубина концентрация лимонной кислоты была увеличена в два раза по сравнению со стандартной методикой для свободных наночастиц [4,5].

Магнитные свойства полученных образцов исследовали методами мессбаэуровской спектроскопии (определение магнитной фазы образца, а также электронных и магнитных свойства ионов железа в наночастицах), а контрастные свойства – методом протонной релаксометрии.

Мессбаэуровские спектры наночастиц оксидов железа получали на спектрометре электродинамического типа (WissEl, Германия) в интервале температур 16–300 К с использованием гелиевого криостата CCS-850 (Janis, США) с температурным контроллером Model 332 (Lake Shore Cryotronics, США). Точность поддержания температуры составляла не менее 0,1 К. В качестве источника излучения использовали  $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$  с активностью 1,1 ГБк. Изомерные сдвиги отсчитывали от центра магнитной сверхтонкой структуры металлического железа. Мессбаэуровские спектры обрабатывали по стандартным программам МНК (LOREN, ИХФ РАН; NORMOS, Германия) в предположении лоренцевой формы линии.

Влияние магнитных наночастиц оксидов железа на изменение основных релаксационных параметров водородсодержащих сред – время спин-спиновой релаксации  $T_2$  и спин-решеточной релаксации  $T_1$  – определяли методом протонной релаксации с помощью ЯМР-релаксометра «Minispec mq» (Bruker, Германия).

По результатам исследований была определена релаксирующая способность образца  $R$  – основной физической параметр, отражающий контрастирующую способность вещества. Данная величина характеризуется тангенсом угла наклона экспериментальной прямой зависимости обратной величины времени релаксации от концентрации.

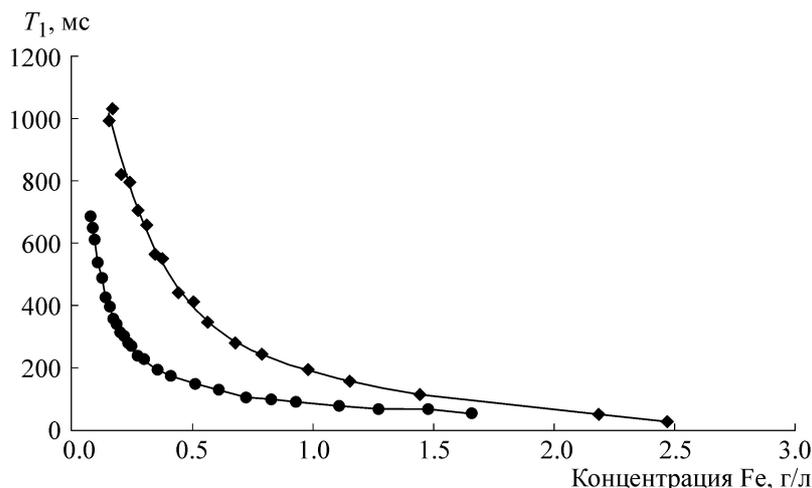
Аттестация полученных образцов включала определение среднего размера наночастиц магнетита с помощью просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе высокого разрешения JEM-1011 (JEOL, Япония), концентрации атомов железа методом рентгенофлуоресцентного анализа и рентгенофазового анализа.

Для оценки цитотоксического действия доксорубина и его конъюгатов с наночастицами был использован спектрофотометрический метод с использованием красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромидный) [8].

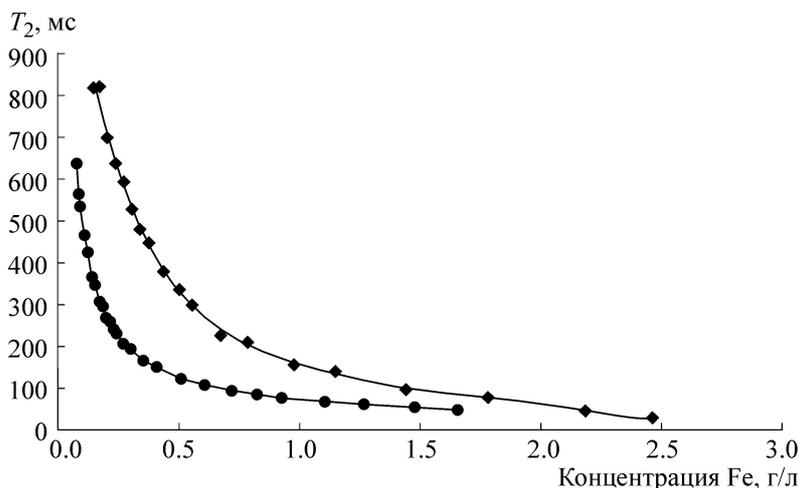
Клетки HeLa инкубировали в течение 48 ч при 37°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  в стандартной культуральной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, с исследуемыми веществами в диапазоне концентрации  $10^{-10}$ – $10^{-4}$  М, после чего в культуральную среду на 3 ч вносили краситель МТТ до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Оптическую плотность образцов регистрировали при длине волны 530 нм на анализаторе иммуноферментных реакций «УНИПЛАН» АИФР-01 (ООО НПП «БИОМЕР», Россия). Оптическую плотность контрольных образцов (выживаемость клеток, равную единице) принимали за 100%. Представлены средние значения трех экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 6.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основой исследований был сравнительный анализ магнитных и, как следствие, магнитно-резонансных контрастных свойств растворов наночастиц, нагруженных доксорубином, по сравнению со свободными наночастицами, полученными в аналогичных условиях. Исследо-



**Рис. 1.** Кривые спада для времени  $T_1$  от концентрации вводимого раствора наночастиц в водородосодержащую среду. Кружки – раствор конъюгата наночастицы и доксорубицина. Ромбы – раствор свободных наночастиц. По оси ординат – время спин-решеточной релаксации  $T_1$ , по оси абсцисс – концентрация железа в водном растворе. Индукция постоянного магнитного поля 0,47 Тл.



**Рис. 2.** Кривые спада для времени  $T_2$  от концентрации вводимого раствора наночастиц в водородосодержащую среду. Кружки – раствор конъюгата наночастицы и доксорубицина. Ромбы – раствор свободных наночастиц. По оси ординат – время спин-спиновой релаксации  $T_2$ , по оси абсцисс – концентрация железа в водном растворе. Индукция постоянного магнитного поля 0,47 Тл.

вания показали, что по данным просвечивающей электронной микроскопии существенных отличий в величине среднего диаметра ядра наночастицы магнетита и ядра конъюгата с доксорубицином не наблюдалось. Средний диаметр составил 9 нм для свободного состояния и 10,2 нм для конъюгата. Рентгенофазовый анализ обоих образцов показал наличие пиков, характерных для магнетита, со средним размером области когерентного рассеяния, определенной по уширению дифракционных пиков, близкой к 10 нм. Концентрация железа в конъюгате оказалась закономерно выше, чем у свободных наночастиц, но путем разбавления во-

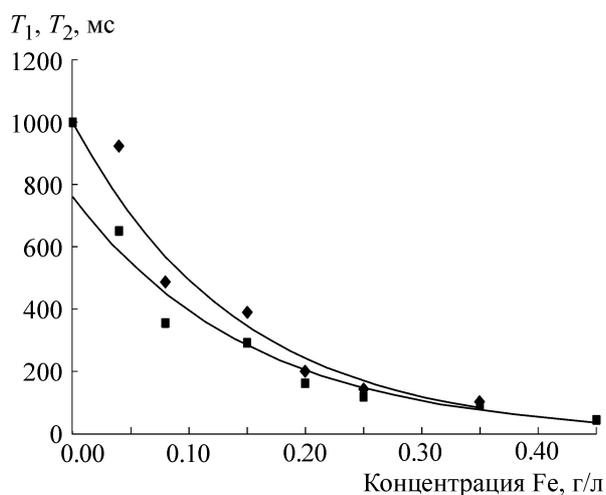
дой были получены равноценные растворы с концентрацией железа 34 г/л. Расчетная концентрация доксорубицина в конъюгате составила 1 г/л.

Методом протонной релаксометрии при величине индукции постоянного магнитного поля 0,47 Тл были получены кривые спада времен  $T_2$  и  $T_1$  в зависимости от концентрации железа в исследуемых образцах в водных растворах (рис. 1 и 2). Сравнительный анализ экспериментальных кривых спада времен  $T_2$  и  $T_1$  в зависимости от концентрации вводимого конъюгата и чистых наночастиц показал, что влияние на релаксационные свойства водородосо-

**Таблица 1.** Релаксационные параметры исследуемых образцов

	$R_1$ , л/(ммоль·с)	$R_2$ , л/(ммоль·с)	$R_1/R_2$
Свободные наночастицы (вода, $T = 40^\circ\text{C}$ )	$20,1 \pm 1,4$	$27,2 \pm 1,6$	0,74
Конъюгат в водной среде	$23,5 \pm 1,4$	$34,7 \pm 1,9$	0,67
Конъюгат в среде доксорубицина (12%)	$14,2 \pm 0,7$	$19,1 \pm 1,1$	0,71

держашей среды у конъюгата выше, чем у чистых наночастиц. Возможным объяснением данного факта является изменение физико-химических свойств исследуемой среды за счет внесения вместе с раствором конъюгата доксорубицина как в свободном, так и в связанном состоянии. Для дополнительного определения релаксирующих свойств наночастиц в конъюгатах был проведен эксперимент, в котором в качестве среды использовали 12%-й водный раствор препарата доксорубицина. В этой среде долю вносимого вместе с конъюгатом доксорубицина можно считать несущественной, а свойства среды неизменными. Результаты подобного эксперимента представлены на рис 3. Анализ полученных экспериментальных кривых показал, что изменение химического состава исследуемой водородсодержащей среды существенно влияет на подвижность атомов водорода в среде и, как следствие, на ее релаксационные свойства. При нулевой концентрации вводимого вещества значения времен  $T_2$  и  $T_1$  в 12%-м растворе доксорубицина составили величину порядка 1000 мс, а в случае дистиллированной воды показали аппроксимационное значение порядка 2000 мс. В этих условиях соотношение  $R_1/R_2$  ( $R_1$  и  $R_2$  – релаксирующие способности соответственно продольной и поперечной ре-



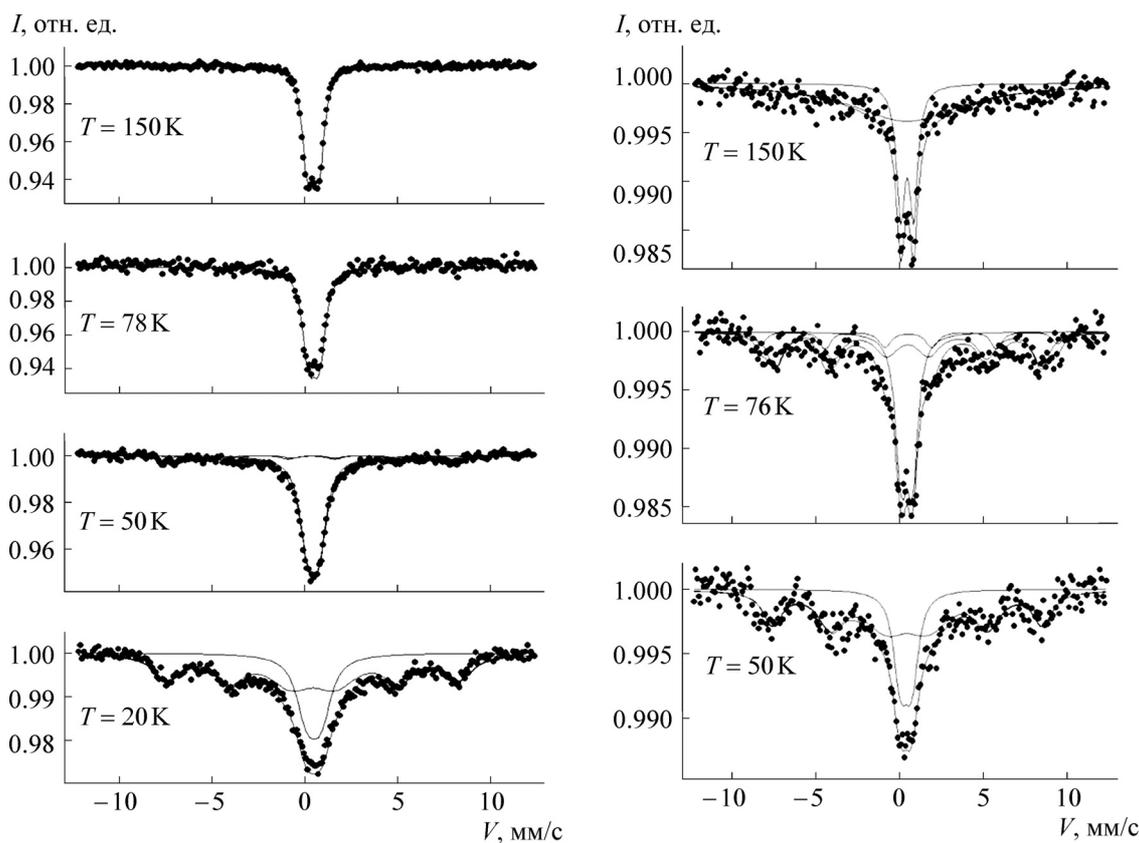
**Рис. 3.** Кривые спада для времен релаксации  $T_1$  (ромбы) и  $T_2$  (квадраты) от концентрации вводимого конъюгата в среду 12% доксорубицина.

лаксации протонов исследуемой водородсодержащей среды [3]) увеличилось на 6% по сравнению с водной средой. Основные экспериментальные параметры, характеризующие магнитно-резонансные контрастные свойства исследуемых образцов, сведены в табл. 1.

Ранее проведенные исследования показали, что соотношение  $R_1/R_2$ , равное  $1,0 \pm 0,3$ , характерно для наночастиц магнетита со средним размером менее 15–20 нм, а соотношение  $R_1/R_2 \leq 0,3$  – для наночастиц магнетита с размером более 20 нм.

Анализ полученных кривых спада как в случае свободных наночастиц, так и для конъюгата, а также значения соотношений  $R_1/R_2$  свидетельствуют о преимущественном содержании сверхмалой фракции наночастиц магнетита, которые характеризуются суперпарамагнитным состоянием. Сравнение значений релаксирующих способностей для свободных наночастиц и связанного состояния в среде раствора доксорубицина показало снижение контрастных свойств конъюгата по сравнению со свободными наночастицами. Последнее можно объяснить изменением подвижности при тепловых флуктуациях магнитных доменов, вследствие влияния присоединенного доксорубицина. Полученные значения для релаксирующих способностей конъюгата в водной среде и в среде доксорубицина можно объяснить изменением физико-химических свойств раствора при внесении в нее молекул доксорубицина, а также адсорбцией молекул доксорубицина на наночастицах. Небольшое снижение соотношения  $R_1/R_2$  с 0,74 до 0,67 также может свидетельствовать о наличии крупноразмерной фракции в конъюгате, которая может появляться при изменении режима химического синтеза конъюгатов по сравнению с режимом синтеза свободных наночастиц.

Магнитные свойства наночастиц магнетита в свободном и связанном состоянии исследовали с помощью метода мессбуэровской спектроскопии. Мессбуэровские спектры обоих образцов носят ярко выраженный релаксационный характер (рис. 4). Анализ вида спектров позволяет характеризовать их как систему, состоящую из малых суперпарамагнитных кластеров нестехиометрического магнетита, близ-



**Рис. 4.** Мессбауэровские спектры образцов на основе свободных наночастиц магнетита (слева) и связанного состояния (справа) при различных температурах. По оси ординат  $I$  – интенсивность радиоактивного излучения атомов  $^{57}\text{Fe}$  (отн. ед.); по оси абсцисс – скорость источника относительно поглотителя, которая за счет эффекта Доплера модулирует энергию испускаемого гамма-кванта.

кого к ферромагнитному оксиду  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Параметры «парамагнитного дублета» в спектрах, а также магнитная сверхтонкая структура характерны для высокоспинового иона  $\text{Fe}^{3+}$  в октаэдрическом окружении ионов кислорода кубической решетки обращенной шпинели [7].

По полученным спектрам можно оценить точку блокирования образцов  $T_B$ , температуру, при которой площади под спектрами «парамагнитного дублета» и сверхтонкой структуры равны друг другу. В случае свободных наночастиц  $T_B = 20$  К, что соответствует размерам кластеров 5–7 нм. В случае связанного конъюгата точка блокирования существенно выше ( $T_B =$

80 К), что соответствует более крупному размеру кластеров. Таким образом, анализ мессбауэровских спектров позволяет охарактеризовать основное магнитное состояние исследуемых образцов как суперпарамагнитное, но с различным размером нанокластеров. Увеличение размеров кластеров в случае конъюгатов с доксорубицином может быть объяснено режимами их химического синтеза.

Анализ цитотоксического действия доксорубина в сравнении с наноконъюгатами на клетки HeLa показал, что  $IC_{50}$  для наноконъюгатов меньше, чем  $IC_{50}$  свободного доксорубина, более чем в три раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

**Таблица 2.** Значения  $IC_{50}$  для доксорубина и конъюгатов доксорубина с наночастицами магнетита в клетках HeLa при инкубации в течение 48 ч

Состав образца	$IC_{50}$ , М	95%-й доверительный интервал $IC_{50}$ , М
Конъюгат наночастиц с доксорубицином	$(7,4 \pm 0,09) \cdot 10^{-8}$ *	$(5,5 \cdot 10^{-8} - 9,9 \cdot 10^{-8})$
Доксорубин	$(2,7 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$	$(2,4 \cdot 10^{-7} - 3,0 \cdot 10^{-7})$

Примечание. \* – Достоверное отличие от значения для доксорубина,  $p < 0,05$ .

Следовательно, цитотоксическая активность конъюгатов в три раза больше, чем свободного доxorубина. Усиление цитотоксического эффекта доxorубина в составе конъюгата с железом может быть связано с повышенным накоплением в клетках конъюгатов по сравнению со свободным доxorубином, так как доxorубин в комплексе с наночастицами не является субстратом для белков транспортеров множественной лекарственной устойчивости [9]. Другой причиной усиления клеточной гибели может быть увеличение продукции супероксид-аниона при образовании комплекса железа с доxorубином [6].

### ВЫВОДЫ

1. Магнитные свойства наночастиц магнетита в свободном и связанном состоянии слабо зависят от состава стабилизирующей оболочки, в том числе и доxorубина, как ее составляющей, и определяются основными физическими параметрами – средним размером наночастиц и фазовым составом.

2. Синтезированные конъюгаты на основе наночастиц магнетита и доxorубина обладают высокой магнитно-резонансной контрастирующей способностью, что можно использовать для визуализации очагов поражения и

для контроля с их помощью доставки противоопухолевого средства в очаг заболевания.

3. Синтезированные конъюгаты на основе наночастиц магнетита и доxorубина превосходят по цитотоксическому действию свободный доxorубин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 14-03-00114

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Т. А. Федотчева, А. Ю. Оленин, К. М. Старостин и др., Хим.-фарм. журн. **49** (4) 39 (2015).
2. K. Tomankova, K. Polakova, K. Pizova, et al., Int. J. Nanomedicine **10**, 949 (2015).
3. А. Г. Акопджанов, Н. Л. Шимановский, В. Ю. Науменко и др., Хим. физика **33** (7), 1 (2014).
4. Н. Л. Шимановский, В. Ю. Науменко, А. Г. Акопджанов и др., Нанотехника **20**, 64 (2009).
5. А. Г. Акопджанов, А. И. Сергеев, Э. В. Манвелов и др., Эксперим. клин. фармакология **73** (6), 23 (2010).
6. Т. А. Федотчева, А. Г. Акопджанов, Н. Л. Шимановский и др., Биофизика **59** (5), 902 (2014).
7. K. Nawara, J. Romiszewski, K. Kijewska, et al., J. Phys. Chem. C **116** (9), 5598 (2012).
8. N. L. Shimanovskii, A. V. Semeikin, T. A. Fedotcheva, et al., Bull. Exp. Biol. Med. **134** (4), 385 (2002).
9. A. Ganguly, S. Basu, P. Chakraborty, et al., PLoS One **55** (6), 11253 (2010).

## Preparation of Magnetite Nanoparticles Conjugate with Doxorubicin and its Magnetic Resonance and Cytotoxic Properties

A.G. Akopdzhanov\*, N.L. Shimanovskii\*, T.A. Fedotcheva\* \*\*, V.K. Imshennik\*\*\*, Y.V. Maksimov\*\*\*, and S.V. Novichihin\*\*\*

\*Russian National Pirogov Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

\*\*All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants, ul. Grina 7, Moscow, 117216 Russia

\*\*\*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

The paper describes the possibility of increasing the anticancer drug doxorubicin effectiveness in complex with ultrasmall magnetic iron oxide nanoparticles. A method for the binding of doxorubicin molecules to magnetic nanoparticles by adding citric acid is suggested. The main magnetic properties of the obtained conjugates were studied using proton relaxometry and Mössbauer spectroscopy, their cytotoxic activity was assessed by MTT-based spectrophotometric assay on HeLa cell culture. It was shown that conjugates based on magnetite nanoparticles and doxorubicin have high contrast ability in magnetic resonance imaging. The magnetic properties of free/bound magnetite nanoparticles weakly depend on the composition of stabilizing coating and are determined by average size of nano-objects and phase composition. The cytotoxic effects of newly synthesized conjugates based on magnetite nanoparticles and doxorubicin are higher than those of free doxorubicin providing the possibility of enhancing anti-tumor effect of doxorubicin and controlling the dynamics of the delivery of the conjugate in the hearth of the disease due to nanoparticles as magnetic contrast agents.

*Key words:* iron oxide nanoparticles, magnetite, doxorubicin, proton relaxometry, Mössbauer spectroscopy