

## ЗАВИСИМОСТЬ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНЫХ КОНТРАСТНЫХ СВОЙСТВ СВЕРХМАЛЫХ НАНОЧАСТИЦ СЛОЖНОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ОТ ИХ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

© 2018 г. А.Г. Акопджанов, А.И. Борисова, Г.А. Фролов\*, Т.Ф. Шайхутдинов\*, Н.Д. Шайхутдинова\*, Т.А. Федотчева, Н.Л. Шимановский

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

*\*Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049, Москва, Ленинский проспект, 4*

*E-mail: artura777@mail.ru, aarisa2012@yandex.ru*

Поступила в редакцию 04.04.18 г.

Рассмотрены вопросы оптимизации магнитно-резонансных контрастных свойств наносистем на основе сверхмалых наночастиц сложного оксида железа путем модификацией их химического состава соединениями марганца, магния, цинка или кобальта. Исследована взаимосвязь между химическим составом, кристаллической структурой, магнитной фазой и контрастными свойствами наночастиц. Описано исследование сравнительной цитотоксичности растворов наночастиц на культуре клеток HeLa. Показана перспективность таких наносистем для разработки контрастных средств для магнитно-резонансной томографии с преимущественным влиянием на параметры T1 или T2 тканей организма.

*Ключевые слова: наночастицы, сложный оксид железа, химический синтез препаратов, МРТ-контрастные средства, протонная релаксометрия.*

Магнитные наночастицы сложного оксида железа и системы на их основе являются перспективным материалом для создания новых контрастных средств для магнитно-резонансной томографии. Проведенные нами исследования [1], а также анализ научных публикаций [2] показали, что системы разноразмерных наночастиц сложного оксида железа позволяют эффективно повышать качество и контрастность изображений, получаемых методом магнитно-резонансной томографии, а также обладают важной способностью накапливаться в очаге онкологического заболевания [3].

Магнитно-резонансные контрастные свойства парамагнитных наночастиц определяются химическим составом, характерным размером, кристаллической структурой, магнитно-фазовым составом и состоянием поверхности. Существуют возможности контроля всех перечисленных факторов выбором режимов химического синтеза наночастиц. Основным фактором является характерный размер, при этом наночастицы размером 7–12 нм образуют суперпарамагнитные системы и могут являться одновременно T1- и T2-контрастными веществами, а ферримагнитные наночастицы размером 20–40 нм преимущественно влияют на время ре-

лаксации T2. Такие наночастицы размером выше 30 нм активно поглощаются ретикуло-эндотелиальной системой и эффективны для диагностики заболеваний печени и лимфатических узлов [4,5].

Использование наночастиц в качестве фармакологических веществ кроме наличия у них необходимых физических свойств предполагает выполнение ряда требований: наночастицы должны образовывать устойчивую коллоидную систему, удовлетворять требованиям биосовместимости и иметь фиксированное значение pH, близкое к физиологической величине. Цитотоксические свойства наноматериалов зависят не только от химического состава, но и от характерного размера объектов и состояния поверхности. Методика синтеза растворов сверхмалых наночастиц предполагает активное использование стабилизаторов, препятствующих процессам агрегации и позволяющих снизить активность развитой поверхности.

Для оптимального клинического использования сверхмалых наночастиц необходимо повысить их релаксационные характеристики и достичь преимущественного влияния по одному из основных биофизических параметров – времени T1 или T2 протонной релаксации биоло-

гической ткани. В данной статье рассматриваются вопросы влияния на релаксационную активность наночастиц магнетита модификацией их химического состава – частичной заменой двухвалентных атомов железа в структуре магнетита двухвалентным атомом лиганда. В качестве лигандов были использованы магнитные металлы с характерным радиусом ядра, близким к радиусу ядра атома железа. Рассмотрены вопросы формирования наночастиц различного химического состава и влияния локальных магнитных полей, создаваемых их растворами, на времена продольной и поперечной релаксации водородосодержащих сред во внешнем магнитном поле. Представлены результаты исследований цитотоксических свойств наночастиц, легированных различными магнитными атомами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые нами растворы наночастиц были получены модифицированным методом химического синтеза, основанном на гидролизе двухвалентных и трехвалентных солей железа и подробно описанном ранее [6].

При подборе режимов химического синтеза наночастиц были выбраны условия, позволяющие сохранить характерный размер основной кристаллической и магнитно-фазовой структуры магнетита. Выбор лиганда определялся его магнитными свойствами, наличием атомов второй валентности и, по возможности, близкой к железу атомной массы; условиям биосовместимости конечных наночастиц. В качестве химических лигандов для модификации наночастиц оксида железа были выбраны двухвалентные атомы парамагнитных марганца и магния, ферромагнетика кобальта и диамагнетика цинка. В качестве исходных реактивов для химической реакции синтеза использовали соответствующие сульфаты двухвалентных металлов. Магнитная фаза выбранных лигандов определялась в соответствии с табличным значением магнитной проницаемости. Соединения марганца для повышения релаксивности предпочтительнее, так как сильно влияют на скорость релаксации протонов. Также существуют данные о клиническом применении соединений марганца в качестве контрастного средства.

Механизмы формирования наночастиц сложного оксида железа были подробно исследованы нами ранее [6]. Размер наночастиц определяется динамикой изменения промежуточного рН раствора в ходе химического синтеза, а также выбором стабилизаторов. Важным является смещение концентрационного соотношения исходных реактивов в область двухвалент-

ного железа. Дисперсность осадка, полученного в ходе химической реакции, определяется двумя процессами – образованием зародышей и ростом частиц. Каждый из процессов характеризуется оптимальной динамикой изменения рН раствора, которая контролируется выбором режимов синтеза. Исходное соотношение солей двухвалентного железа и солей лигандов определяли расчетным образом по соответствующему ионному соотношению так, чтобы доля атомов лиганда в наночастицах не превышала 50%. Дальнейшее увеличение исходной концентрации лиганда приводило к существенным искажениям кристаллической структуры сверхмалой наночастицы сложного оксида железа и, как следствие, вело к разрушению его магнитной структуры. Как и в случае получения раствора наночастиц сложного оксида, гидроксид аммония  $\text{NH}_4\text{OH}$  добавляли в избыточной концентрации с промежуточным введением в раствор лимонной кислоты как стабилизатора поверхности и средства контроля значения рН промежуточного раствора. Количество неизменных исходных веществ химических реакций, в том числе стабилизаторов, во всех случаях оставалось постоянным для адекватного сравнения характеристик полученных растворов.

В качестве регулятора роста зародышей использовали лимонную кислоту (2-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбовонную кислоту), которая приемлема с биологической точки зрения и позволяет контролировать динамику промежуточных значений рН. В качестве стабилизатора структуры коллоидного раствора применяли цитрат натрия. При выборе концентраций стабилизаторов преследовали принцип минимизации их количества (с учетом их отрицательного влияния на контрастные характеристики), достаточного для достижения необходимых показателей сохранения размеров наночастиц и стабильности раствора. По результатам токсикологических исследований были выбраны оптимальные концентрации и режимы введения стабилизаторов, концентрации которых для всех полученных растворов составили: лимонной кислоты – 12 г/л, цитрата натрия – 44 г/л [7]. Крупную фракцию наночастиц отделяли с помощью центрифугирования, с учетом минимизации потерь в концентрации основного действующего вещества. Были выбраны оптимальные режимы – три пятиминутных серии центрифугирования со скоростью 800 об./мин и фильтрация. Конечное значение рН раствора для всех образцов составило 7,2.

Исследования стабильности полученных растворов, проведенные путем периодического отделения крупной фракции центрифугирова-

**Таблица 1.** Экспериментальные значения T1- и T2-релаксивности исследуемых растворов наночастиц и их размер

	Характерный размер, нм	R1, л/(ммоль·с)	R2, л/(ммоль·с)
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8 ± 1	3,23 ± 0,32	4,62 ± 0,46
MgFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	9 ± 1	1,01 ± 0,10	1,47 ± 0,15
ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8 ± 2	1,66 ± 0,17	3,08 ± 0,31
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	14 ± 3	1,47 ± 0,15	8,79 ± 0,88
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	6 ± 1	8,48 ± 0,85	17,63 ± 1,76

Примечание.  $T = 40^{\circ}\text{C}$ , pH 7,2.

нием, показали стабильность конечной структуры и основных физических свойств растворов в течение шести месяцев. Расслоение и интенсивное формирование осадка в течение данного периода не наблюдалось.

Размер наночастиц и их фазовый состав определяли с помощью электронного микроскопа высокого разрешения JEOL JEM-1011. Полученные изображения статистически обрабатывали с помощью программного пакета Scan Soft 2000. Фазовый состав полученных наночастиц определяли путем сравнения электроннодифракционных картин полученных образцов с массивным эталоном для сложного оксида Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Концентрации основного действующего вещества полученных растворов определили на рентгенофлюоресцентном анализаторе «Х-арт М» (ЗАО «Комита», Россия). Параметры эксперимента – напряжение 8 кВ и ток 100 мкА. В качестве аналитического параметра использовали площадь пика анализируемого элемента за вычетом площади фона под пиком. В случае наличия двух или более атомов в составе наночастиц экспериментальный спектр представлял собой суперпозицию пиков исходных металлов. Концентрацию металлов определяли по соотношению площадей под спектром для исследуемого образца и эталонного с известной концентрацией.

Магнитно-резонансные контрастные свойства исследовали методом протонной релаксометрии на ЯМР-релаксметре «Minispec mq» (BRUKER Optic GmbH, Германия). Основная частота магнита составляла 20 МГц (470 мТл). Внутренняя воздушная циркуляция позволяла поддерживать температуру 40°C. Использовали импульсные последовательности «инверсия–восстановление» для регистрации времен T1 и КПМГ (последовательность Карра, Перселла, Мейбума, Гилла; английская аббревиатура CPMG) для регистрации времен T2. Кривые спада соответствующих времен релаксации T1 и T2 от концентрации вводимых в водородо-

содержащую среду наночастиц позволили определить экспериментальные значения релаксивностей.

Токсические свойства полученных наночастиц определяли методом МТТ-теста на культуре клеток HeLa при временах инкубации 24 и 48 ч. Обработку результатов проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни с достоверным отличием для результатов различных концентраций друг от друга при  $P \leq 0,05$ . Жизнеспособность культуры клеток в присутствии исследуемых препаратов определяли по сравнению с контролем. В качестве основного параметра оценки жизнеспособности использовали величину  $IC_{50}$  – концентрацию полумаксимального ингибирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аттестацию полученных наночастиц проводили комплексом методов с целью определения фазового состава, нахождения среднего размера и распределения по размерам наночастиц, а также концентрации основного действующего вещества в коллоидном растворе. Анализ микрофотографий, полученных методом электронной микроскопии, позволил определить дисперсный состав полученных растворов. Все растворы содержали основную фракцию сверхмалых наночастиц (7–15 нм) и дополнительную более крупную (40–50 нм). Доля крупной фракции не превышала 20% и представляла собой агрегаты сверхмалых наночастиц. Экспериментально были определены характерные размеры наночастиц для мелкой фракции (табл. 1). Существенно отличались образцы, содержащие в своем составе Co, их характерный размер достигал 14–18 нм.

Исследования фазового состава показали, что сверхмалые наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> имеют стандартную структуру шпинели, соответствующую структуре магнетита с идентичным положением дифракционных колец. Кольца были существ-

венно размыты по сравнению с эталонным образцом, что, вероятно, объясняется сверхмалым (до 10 нм) размером наночастиц и связанными с этим искажениями стандартной кристаллической структуры. Анализ экспериментальных результатов для всех наночастиц с лигандом показал сохранение положений дифракционных максимумов, характерных для структуры магнетита, что свидетельствует о неполном замещении атомов двухвалентного железа. В случае  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  наблюдалось максимальное размытие дифракционных колец, что объясняется, вероятно, дополнительными искажениями кристаллической решетки магнетита лигандом Mn. Наночастицы  $\text{MgFe}_2\text{O}_4$  и  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  характеризовались промежуточным размытием дифракционных колец. Образец, содержащий Co, характеризовался наиболее четкой и близкой к эталону дифракционной картиной. Данный результат можно связать с относительно более крупным размером полученных наночастиц и, как следствие, более высокой степенью упорядоченности структуры, а также, возможно, влиянием лиганда Co на формирование кристаллической структуры наночастицы (рис. 1).

Концентрация основного действующего вещества в растворе наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  составила 27 г/л. Соотношения площадей для всех наночастиц с лигандом, кроме кобальта, составило 1,08–1,19, что свидетельствует об одинаковом содержании наночастиц в полученных образцах. Соотношение площадей элементов для наночастиц, содержащих кобальт, составляет 1,56, что говорит о меньшем содержании частиц по сравнению с образцом сравнения. Определено, что цитотоксичность растворов зависит от размера частиц, состояния поверхности и концентраций стабилизаторов; с увеличением размера частиц токсичность наночастиц существенно снижается [8,9]. Предполагается, что токсичность нанообъектов связана с развитой поверхностью наночастиц и как следствие существенно зависит от характерного размера наночастиц. Экспериментальные исследования, проведенные для полученных образцов, показали, что цитотоксичность сверхмалых наночастиц существенно не зависит от времени инкубации, хотя имеется тенденция к ее снижению при увеличении времени инкубации с 24 до 48 ч (рис. 2). Значения величин  $IC_{50}$  представлены в табл. 2. Анализ полученных результатов показал, что критические концентрации для всех полученных образцов практически в 1000 раз превышают расчетную фармакологически значимую дозу, поэтому данные растворы можно признать биосовместимыми. Необходимо выделить наночастицы, содержащие цинк, токсичность которых

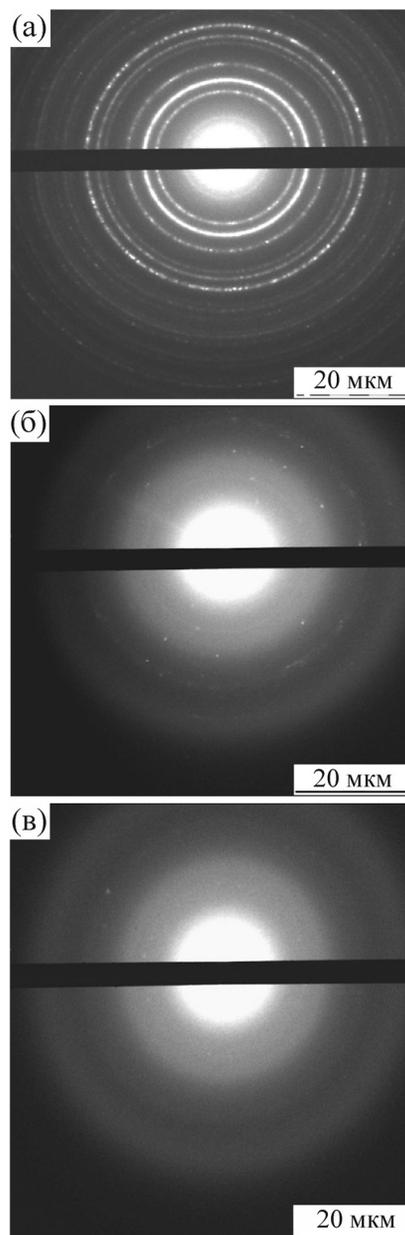
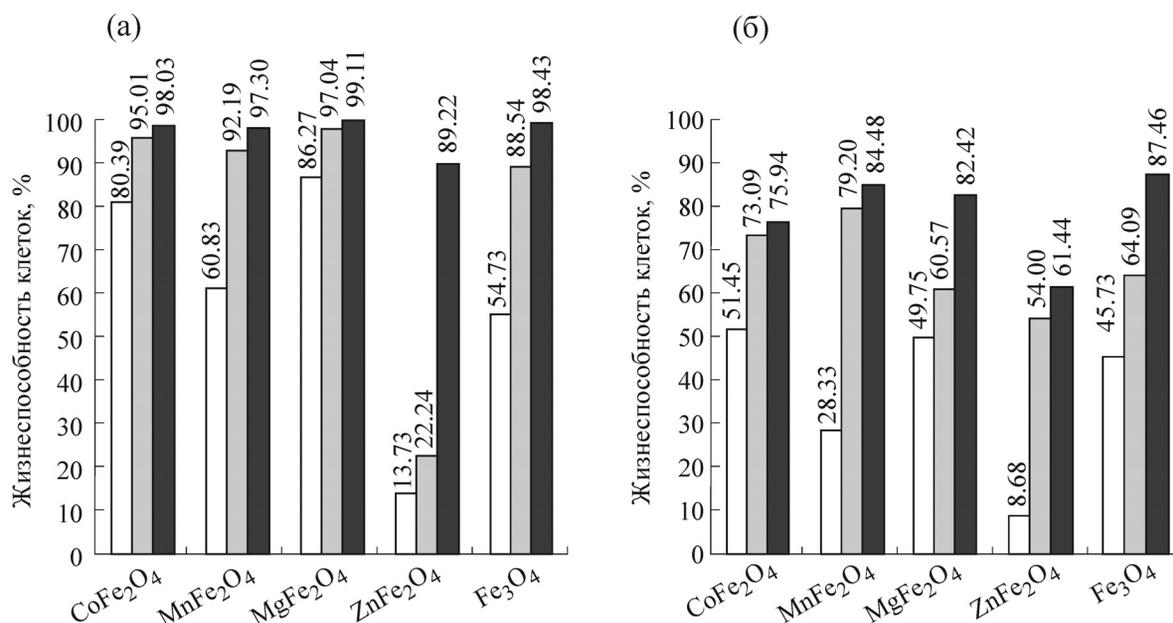


Рис. 1. Дифракционные картины исследуемых образцов: (а) –  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (б) –  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , (в) –  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ .

на порядок превышает токсичность других полученных образцов, что, по-видимому, при схожем характерном размере связано с цитотоксичностью самого цинка и содержащих его остаточных продуктов химических реакций. Существует вероятность, что высокая цитотоксичность наночастиц, содержащих цинк, связана с особенностями формирования и состояния поверхности данных наночастиц. Одним из основных факторов, влияющих на возможную токсичность наночастиц, является состояние модифицирующего поверхностного слоя и природа вещества модификатора. Выбор модифи-



**Рис. 2.** Жизнеспособность клеток линии HeLa, при 24-часовой (а) и 48-часовой (б) инкубации с наночастицами, выраженная в % от контроля. Концентрация наночастиц: светлые столбики –  $10^{-2}$  г/л, серые столбики –  $10^{-3}$  г/л, темные столбики –  $10^{-4}$  г/л.

катора также должен быть обусловлен биологической безопасностью и процедурами дальнейшего фармакологического применения. Магнитно-резонансные контрастные характеристики полученных растворов были определены методом протонно-резонансной релаксометрии, экспериментальные значения величин релаксивностей представлены в табл. 1. В соответствии с проведенными ранее исследованиями [3] было показано, что относительная близость величин релаксирующих способностей  $R1 \approx R2$  для наночастиц магнетита косвенно свидетельствует об их суперпарамагнитном состоянии. На основании этого можно сделать вывод, что полученные сверхмалые наночастицы, содержащие Mn, Mg, и Zn, по данным метода протонной релаксаметрии характеризуются суперпарамагнитным состоянием. Необходимо особо выделить наночастицы, содержащие Co, у которых экспериментальное значение релакси-

рующей способности  $R2$  более чем в пять раз превосходит величину  $R1$ . Как правило, это свидетельствует о ферримагнитной структуре наночастиц, но при несущественном росте характерного размера наночастиц Co до 12–16 нм относительно наночастиц магнетита (6 нм) столь малый размер недостаточен для формирования многодоменной структуры. Об определяющей роли структурных факторов свидетельствует то, что наночастицы, содержащие диамагнетик цинк, превосходят по экспериментальным значениям релаксивности  $R1$  и  $R2$  наночастицы, содержащие атомы магнитного металла Mg, практически в два раза. Изменение релаксирующих способностей легированных наночастиц, по сравнению с нелегированными наночастицами магнетита близкого характерного размера, вероятно объясняется искажениями кристаллической и доменной структуры, вызванными введением лиганда. Для случая рас-

**Таблица 2.** Экспериментальные значения величины  $IC_{50}$  для исследуемых растворов при различных временах инкубации

	$IC_{50}$ , мг/мл, $T = 24$ ч	$IC_{50}$ , мг/мл, $T = 48$ ч
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	$4,35 \cdot 10^{-5}$	$1,57 \cdot 10^{-5}$
MgFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	$1,51 \cdot 10^{-3}$	$3,09 \cdot 10^{-5}$
ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	$1,32 \cdot 10^{-6}$	$4,23 \cdot 10^{-6}$
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	$1,23 \cdot 10^{-3}$	$3,03 \cdot 10^{-5}$
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	$3,69 \cdot 10^{-5}$	$2,52 \cdot 10^{-5}$

смаатриваемых сверхмалых наночастиц, образующих суперпарамагнитные системы, влияние лиганда на магнитно-фазовый состав весьма ограничено. Данная гипотеза в целом сочетается с данными электронной микроскопии – при схожем значении характерных размеров наночастиц дифракционные картины образцов с лигандами отличаются выраженным размытием характерных колец по сравнению с образцом магнетита.

Таким образом, в соответствии с требованиями, которые предъявляет современная клиническая магнитно-резонансная диагностика, растворы сверхмалых наночастиц магнетита, легированные марганцем и кобальтом, позволяют обеспечить преимущественное контрастирование по одному из параметров (T1 или T2).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-03-00539).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Л. Шимановский, А. Г. Акопджанов, А. И. Сергеев и др., Эксперим. клинич. фармакология **73** (6), 23 (2010).
2. J. Mosayebi, M. Kiyasatfar, and S. Laurent, Adv. Healthc. Mater. **6** (23) (2017). DOI: 10.1002/adhm.201700306.
3. А. Г. Акопджанов, А. В. Бабич, И. В. Быков и др., Биомед. радиоэлектроника, № 9, 28 (2011).
4. P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, et al., Adv. Drug Delivery Rev. **61**, 428 (2009).
5. W. Jiang, Y. S. KimBetty, J. T. Rutka, et al., Nat. Nanotechnol. **3**, 145 (2008).
6. А. Г. Акопджанов, Н. Л. Шимановский, В. Ю. Науменко и др., Хим. физика **33** (7), 1 (2014).
7. Н. Л. Шимановский, В. Ю. Науменко, А. Г. Акопджанов и др., Вестн. РГМУ, № 2, 62 (2011).
8. Т. А. Федотчева, Н. И. Федотчева, В. В. Теплова и др., Вопр. биол., мед. и фармацевтич. химии **11**, 158 (2011).
9. А. Г. Акопджанов, Н. Л. Шимановский, Т. А. Федотчева и др., Биофизика **61** (6), 1073 (2016).

## The Dependence of Magnetic-Resonance Contrast Imaging Properties of Ultrasmall Nanoparticles of Complex Iron Oxide on Their Chemical Composition

A.G. Akopdzhanov\*, A.I. Borisova\*, G.A. Frolov\*\*, T.F. Shaikhutdinov\*\*, N.D. Shaikhutdinova\*\*, T.A. Fedotcheva\*, and N.L. Schimanowsky\*

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

\*\*National University of Science and Technology MISIS, Leninskii prosp. 4, Moscow, 119049 Russia

In this paper, we considered the issues on optimization of magnetic resonance imaging properties of nanosystems based on ultrasmall nanoparticles of complex iron oxide by modifying their chemical composition with Zn, Mn, Mg, or Co. The relationship between the chemical composition, the crystal structure, the magnetic phase, and the imaging properties of contrast nanoparticles was investigated. The comparative cytotoxicity of nanoparticle solutions on the culture of HeLa cells was studied and described. The prospects for these types of nanosystems for the development of contrast MRI agents with the predominant effect on T1 or T2 tissue parameters of the organism were shown.

*Keywords: nanoparticles, complex iron oxide, chemical synthesis of preparations, MRI-contrast agents, proton relaxometry*