

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи

GERMAN SERGEY VIKTOROVICH

***IN VITRO* И *IN VIVO* ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГИДРОЗОЛЕЙ МАГНЕТИТА,
МАГНИТОЛИПОСОМ И МАГНИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ МЕТОДОМ
МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ**

03.01.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Саратов – 2016

Работа выполнена на кафедре физики полупроводников факультета нано- и биомедицинских технологий ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент **Горин Дмитрий Александрович**

Официальные оппоненты:

Директор образовательно-научного центра «Нanomатериалы и нанотехнологии» Тамбовского государственного университета им. Г.Р. Державина, д.ф.-м.н., заслуженный деятель науки РФ, профессор **Головин Юрий Иванович**

ВРИО директора Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, д.х.н, доцент **Иванов Владимир Константинович**

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южный Федеральный Университет» (ЮФУ). Адрес: 344006, г. Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42.

Защита диссертации состоится 28 января 2016 года в 15:30 в корпусе 3, аудитории 34 на заседании ученого совета Д212.243.05 на базе Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д. ф.-м. н., профессор



Дербов Владимир Леонардович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

За сравнительно небольшое время, прошедшее с момента публикации в 1973 году в журнале «Nature» статьи Пола Лаутербура, где впервые была предложена идея «создания изображения с помощью индуцированного локального взаимодействия», магнитно-резонансная томография (МРТ) стала одним из наиболее эффективных и информативных методов неинвазивной диагностики в медицине [1]. В отличие от большинства других методов визуализации, применяемых в биомедицине, магнитно-резонансная томография позволяет получать изображения при помощи различных механизмов контрастирования, таких как плотность протонов, T1, T2 и T2* [2]. В настоящее время, благодаря возможности визуализации гидрозолей магнетита, МРТ позволяет развивать новое направление медицины, называемое тераностикой [3], которое предполагает создание объектов, совмещающих в себе диагностическую и терапевтическую функции. Наночастицы магнетита отвечают требованиям, предъявляемым этой концепцией, так как позволяют не только оказывать локальное терапевтическое (термическое) воздействие на ткани за счет преобразования электромагнитной энергии в тепловую [4], но и могут применяться в качестве контрастирующих агентов для диагностики патологий с помощью МРТ [5].

В настоящее время контрастирующие препараты, содержащие суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, используются в качестве T2 контрастирующих агентов, ускоряющих преимущественно спин-спиновую релаксацию [6]. При определенных условиях наночастицы магнетита могут уменьшать время спин-решеточной релаксации, т.е. контрастировать на T1 взвешенных МР (магнитно-резонансных) томограммах [2], однако в настоящее время отсутствуют результаты систематического исследования зависимости интенсивности МР сигнала на T1 взвешенных изображениях от концентрации наночастиц магнетита, несмотря на то, что данная информация могла бы быть полезна для изучения распределения наночастиц магнетита *in vivo* с использованием МРТ.

Возможность контрастирования области интереса на T1 и T2 взвешенных изображениях, предположительно, можно использовать, для повышения точности диагностирования при МРТ. На данный момент существует проблема различия влияния контрастирующих агентов и артефактов на МР изображения. Артефакты МРТ, которые обычно связаны с результатами протекания эндогенных процессов, например уплотнение тканей, наличие жира, кровоизлияний, сгустков крови и

наличие воздуха, вызывают проблемы при диагностировании, поскольку они имитируют сигналы, поступающие от МР контрастирующих агентов. Благодаря использованию контрастирующих агентов, изменяющих T1 и T2 релаксацию, исключается возможность ложного диагностирования из-за влияния подобных артефактов.

Одно из стремительно развивающихся направлений современной биомедицины связано с созданием эффективных систем адресной доставки биологически активных веществ. В качестве подобных систем могут быть использованы, как липосомы [7], так и полиэлектролитные капсулы [8]. Для выбора биоактивного вещества для инкапсуляции во внутренний объем капсул или липосом, необходима информация о биораспределении самих средств доставки, которую можно получить, используя магнитные наночастицы в качестве маркеров для *in vivo* визуализации методом МРТ [9]. Полиэлектролитные микрокапсулы, полученные методом последовательной адсорбции, предоставляют большие возможности для варьирования концентрации наночастиц, характера их распределения внутри оболочки по сравнению с липосомами. С другой стороны, для полиэлектролитных капсул до сих пор являются актуальными вопросы, связанные с изучением их биораспределения и исследования кинетики биodeградации их оболочек *in vivo* в зависимости от вида парентерального введения (подкожно, внутримышечно, внутривенно).

Цель и задачи диссертационной работы.

Целью данной работы является *in vitro* и *in vivo* визуализация липосом и нанокompозитных биodeградируемых микрокапсул, содержащих наночастицы магнетита, методом магнитно-резонансной томографии, и сравнение их контрастирующих свойств с гидрозолем магнетита, а также получение микрокапсул с заданным контрастированием на T1 и T2 взвешенных изображениях.

Для достижения этой цели были решены следующие задачи:

1. оптимизация метода получения гидрозоля магнетита и разработка принципиальной схемы химического реактора для получения гидрозоля магнетита с возможностью контроля окисления наночастиц и поддержания стерильных условий во всех внутренних емкостях устройства и ее практическая реализация;
2. оценка токсичности наночастиц магнетита на основе результатов их взаимодействия с нейтрофильными гранулоцитами, а также на основании

морфологических исследований тканей органов крыс при внутрибрюшинном введении и биораспределения магнитных наночастиц на основе результатов МРТ исследований;

3. получение магнитолипосом с заключенными во внутреннем объеме наночастицами магнетита и изучение методом динамического рассеяния света факторов, влияющих на их стабильность во времени.;
4. сравнительный анализ МРТ изображений фантомов, содержащих магнитолипосомы и гидрозолы магнетита в различной концентрации, а также *in vivo* визуализация магнитолипосом методом МРТ и изучение морфологических изменений в тканях при их интратуморальном введении;
5. изучение магнитных свойств и морфологии поверхности планарных нанокompозитных структур, полученных методом последовательной адсорбции наночастиц магнетита и полиэлектролитов из их растворов на поверхность кремниевых подложек;
6. получение микрокапсул на основе наночастиц магнетита и биосовместимых биodeградируемых полимеров, их *in vitro* и *in vivo* визуализация методом МРТ, а также изучение их биораспределения и токсичности при внутривенном введении;
7. изучение закономерностей изменений МР сигнала, сопровождающих ферментативную деградацию нанокompозитных микрокапсул, содержащих наночастицы магнетита, *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна работы.

1. Показана возможность использования цитрат-стабилизированных наночастиц магнетита и магнитолипосом для увеличения контрастирования области интереса на T1 взвешенных изображениях и определения концентрации наночастиц, используя значения интенсивности T1 и T2 взвешенных сигналов.
2. Продемонстрировано, что использование наночастиц магнетита, изменяющих как продольную релаксацию протонов, так и поперечную релаксацию, обеспечивает возможность повышения достоверности визуализации объектов и тканей *in vitro* и *in vivo* методом МРТ.
3. Показано, что магнитные микрокапсулы на основе биосовместимых полимеров, изначально не контрастирующие в МРТ, обнаруживают контрастирующие свойства после ферментативной деградации их оболочек вследствие высвобождения наночастиц магнетита.
4. Установлен характер биораспределения магнитных микрокапсул при внутривенном введении с течением времени.

Практическая значимость работы.

1. Создана экспериментальная установка для синтеза гидрозолей магнетита, позволяющая сохранить стерильные условия во время синтеза и промывки наночастиц, а также обеспечить проведение синтеза в инертной атмосфере, что минимизирует процесс окисления наночастиц.
2. Получены моноламеллярные магнитолипосомы с большой эффективностью загрузки гидрофильных наночастиц магнетита, которые могут быть использованы в качестве контрастирующих агентов для МРТ исследований.
3. Показано, что капсулирование наночастиц в липосомы позволяет контролируемо повысить эффективность контрастирования области интереса на T2 взвешенных изображениях.
4. Получены биodeградируемые нанокомпозитные микрокапсулы с высоким содержанием наночастиц магнетита.
5. Предложен способ оценки деградации микрокапсул *in vivo* с помощью анализа МР томограмм.
6. Показана возможность управления контрастированием полиэлектролитных магнитных микрокапсул путем изменения в них концентрации наночастиц магнетита.

Достоверность полученных результатов.

Достоверность полученных результатов обусловлена применением в экспериментах апробированных методик измерения, использованием стандартной измерительной аппаратуры и подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных в пределах установленных погрешностей, а также их соответствием результатам, полученным другими исследователями.

Основные положения и результаты исследований, выносимые на защиту.

На защиту выносятся следующие результаты исследований:

1. Магнитолипосомы более эффективно уменьшают время поперечной релаксации (T2) протонов по сравнению с гидрозолем наночастиц при одинаковых концентрациях в расчете на магнетит. Следовательно, на T2 взвешенных изображениях магнитолипосомы эффективнее увеличивают контраст области интереса по сравнению с гидрозолем наночастиц.

2. При ферментативной деградации оболочек микрокапсул на основе поли-L-аргинина и натриевой соли декстран сульфата, содержащих наночастицы магнетита с высокой концентрацией в составе оболочки, наблюдается контрастирование области интереса на МР изображениях, обусловленное увеличением среднего расстояния между наночастицами, в то время как исходные микрокапсулы до деградации не являются контрастирующими.
3. При внутривенном введении магнитных нанокompозитных микрокапсул диаметром 3-5 мкм на основе поли-L-аргинина и натриевой соли декстран сульфата, в дозировке $2,5 \times 10^9$ капсул/кг (в расчете на магнетит - 15 мг/кг) максимальное накопление в почках наблюдается через 15 минут после введения, в легких - через 4 часа, в печени и сердце – через 1 час, а в селезенке - через 24 часа. В печени микрокапсулы разрушаются через 24 часа после введения, и наночастицы магнетита, высвобожденные в результате разрушения оболочки, контрастируют в течение последующих 7 дней.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях:

1. 3-я Международная школа-семинар «Nanoparticles, Nanostructured Coatings and Microcontainers: Technology, Properties, Applications» (5-9 мая, 2011, Анталия, Турция).
2. I Всероссийский симпозиум по поверхностно-активным веществам «От коллоидных систем к нанохимии» – Казань, (июнь 2011).
3. Конференция «Post-Genome methods of analysis in biology and laboratory and clinical medicine» (22-24 ноября 2012 г., Казань, Россия).
4. 4-я Международная школа-семинар «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications» (5-9 мая 2013, Гольм-Потсдам, Германия).
5. 1-ая Международная школа-семинар «Dual-Imaging of Nano/Microsized Theranostics» (2-6 сентября 2013 г., медицинский университет Шарите, Берлин, Германия).
6. 5-ая Международная школа-семинар «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications» (9-12 мая 2014, Университет Гента, Гент, Бельгия).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в изданиях, включенных в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ, и 5 тезисов докладов.

Гранты.

Научные исследования, проводимые в рамках диссертационной работы, были поддержаны следующими грантами:

- «Функционализация поверхности дисперсной фазы эмульсионных систем неорганическими наночастицами» (проект РФФИ № 09-03-00245-а);
- «Влияние морфологии, условия получения и внешних воздействий на диэлектрические и магнитные свойства нанокompозитов» (проект РФФИ № 10-08-91219СТ_a);
- «Создание мультифункциональных композитных структур с возможностью адаптации их физико-химических свойств под воздействием ионизирующего и лазерного излучений» (РФФИ № 11-08-12058-ОФИ-м);
- «Создание нанокompозитных материалов на основе термочувствительных браш-полимеров с использованием технологии Ленгмюра-Блоджетт» (проект РФФИ №12-02-31533 (мол_a));
- Грант Правительства Российской Федерации №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации ;
- Грант Евросоюза, программа IRSES(PI) (International Research Staff Exchange Scheme) FP7 — «Люди» (Marie Curie Actions) 2013, «Dual - Imaging Nano/Micro – sized Theranostics (against cancer), DNaMIT», (the Marie Curie project PIRSES-GA-2013-612673);
- «Ворота гематоэнцефалического барьера: механизмы регуляции, их зависимость от состояния организма и возраста, способы коррекции с помощью супрамолекулярных транспортных систем» (проект РФФИ №14-15-00128);
- «Управление физико-химическими характеристиками гетерогенных сред, содержащих неорганические наночастицы, с помощью электромагнитного излучения» (проект РФФИ №14-03-31344);
- «Синтез, модификация и применение магнитных наночастиц для концентрирования и определения биологически активных веществ» (проект РФФИ №15-03-99704).

Личный вклад диссертанта

Личный вклад автора состоял в: создании установки для получения гидрозолей магнетита, получении наночастиц магнетита, нанокомпозитных покрытий и микрокапсул, исследовании образцов методами атомно-силовой микроскопии, динамического рассеяния света и магнитно-резонансной томографии, обработке и анализе экспериментальных данных, а также проведении анализа периодической литературы по соответствующей тематике. При использовании результатов, полученных в соавторстве, приведены ссылки на соответствующие источники.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, списка литературы, включающего 387 источников, и приложения. Общий объем диссертации составляет 115 страниц, включая 27 рисунков и 6 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность темы исследования, раскрыта новизна работы и ее практическая значимость, а также сформулированы цель и задачи исследования.

В первой главе представлен аналитический обзор литературы по теме диссертации. В обзоре подробно рассмотрены методы синтеза и характеристики наночастиц магнетита, описаны подходы, используемые для стабилизации наночастиц и модификации их поверхности для биомедицинских приложений, а также основные свойства наночастиц магнетита. Также рассмотрены способы получения полиэлектролитных слоев и микрокапсул, а также магнитолипосом, в состав которых включены наночастицы магнетита, их свойства и основные области применения. Отдельно рассмотрены подходы к использованию наночастиц оксида железа в качестве контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии, кратко приведены основные принципы увеличения контраста области интереса на МР томограммах с использованием контрастирующих веществ.

Во второй главе описывается методика получения наночастиц магнетита, способы модификации их поверхности и методы, применяемые для их характеристики. Представлены нанокомпозитные покрытия, сформированные методом последовательной адсорбции полиэлектролитов, содержащие катионные и анионные наночастицы магнетита. Полученные композитные покрытия были

использованы в качестве модели для оценки магнитных свойств полиэлектролитных структур, содержащих наночастицы магнетита, в частности магнитных полиэлектролитных микрокапсул.

Синтез наночастиц магнетита проводили методом химического соосаждения солей двух- и трехвалентного железа в присутствии основания [10] с использованием реакционной установки, схема которой представлена на рис. 1.

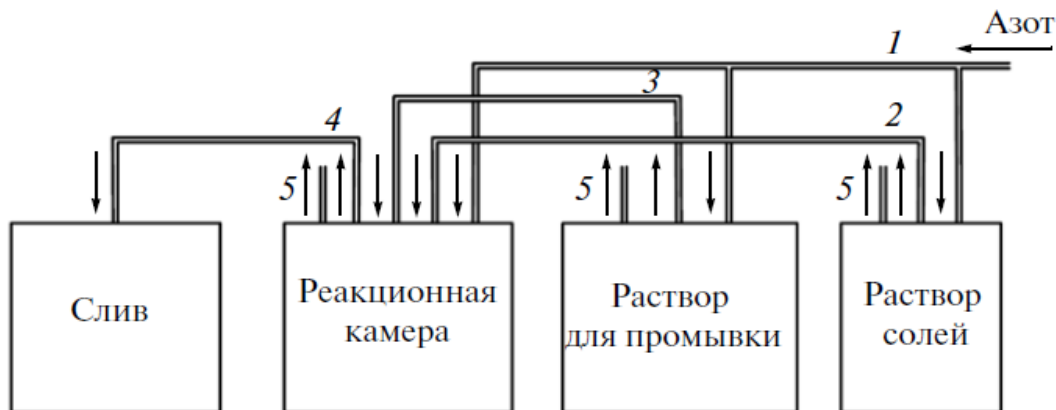


Рис.1 Схема установки для получения наночастиц магнетита

Полученные образцы гидрозолей магнетита были охарактеризованы методами динамического рассеяния света (ДРС), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), спектроскопии комбинационного рассеяния и спектрофотометрии.

Средний размер полученных наночастиц, измеренный методом ДРС, составил 12 ± 3 нм (рис. 2). Электрокинетический потенциал частиц при $pH\ 6.5 \pm 0.1$ составил 30 ± 2 мВ.

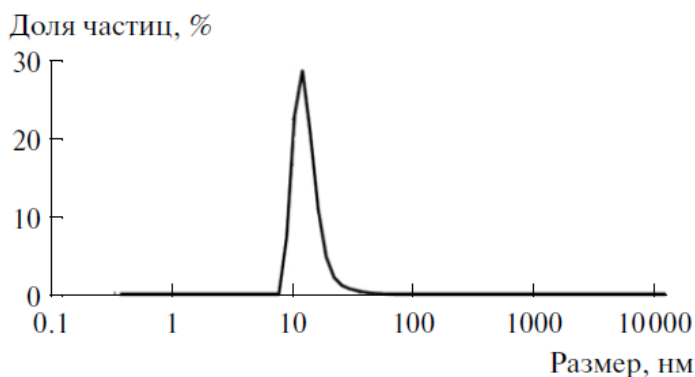


Рис. 2. Распределение наночастиц магнетита по размерам, полученное методом динамического рассеяния света.

С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния показано, что на воздухе происходит окисление наночастиц магнетита с образованием маггемита.

Синтезированные наночастицы магнетита инкапсулировали в моноламеллярные липосомы на основе природных фосфолипидов: фосфатидилхолина из яичного желтка (PC) и фосфатидилинозита (PI) из пекарских дрожжей, содержащих примерно половину остатков насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой), а остальные — ненасыщенных олеиновой и линоленовой кислот. Фосфатидилинозит используется как естественный стерический стабилизатор липосом в кровотоке [11,12]. Магнитолипосомы готовили стандартным методом экструзии.

Для изучения магнитных свойств и морфологии полиэлектролитных структур, содержащих наночастицы магнетита, были получены нанокомпозитные покрытия на основе полиэтиленимина (PEI) и полиаллиламина гидрохлорида (PAH), имеющие следующую структуру (I) PEI/(Fe₃O₄/PAH)₆, (II) PEI/(Fe₃O₄/PAH)₁₁; (III) PEI/(Fe₃O₄/PAH)₁₆, на поверхности пластин монокристаллического кремния с ориентацией (111).

Для получения биodeградируемых микрокапсул композитные слои формировали на поверхности микрочастиц карбоната кальция диаметром 3-5 мкм путем последовательной адсорбции из растворов полиэлектролитов поли-L-аргинина (PArg) и натриевой соли декстран сульфата (DS) (1 мг/мл, 0.15 М NaCl), с последующим растворением темплатов с помощью ЭДТА. Наночастицы магнетита адсорбировали из гидрозоля с концентрацией 1 мг/мл. Оболочки полученных микрокапсул имели состав PArg/DS(PArg/Fe₃O₄)₃/PArg/DS. Атомно-силовые изображения (полученные полуконтактном режиме) микрокапсул при различном увеличении представлены на рисунке 3(а, б). Содержание магнетита в 1 мл суспензии композитных микрокапсул составляет 2,7 мг.

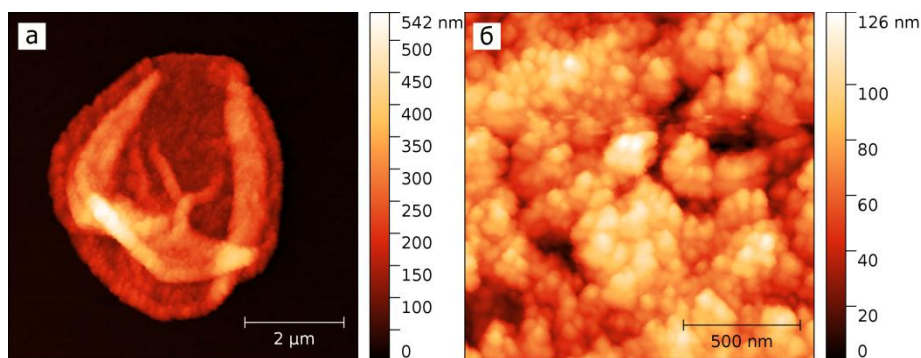


Рис.3. АСМ изображения композитной биodeградируемой микрокапсулы, содержащей наночастицы магнетита (а), и поверхности ее оболочки (б).

Толщина оболочек микрокапсул, измеренная методом АСМ, составляет 54±5 нм (рис. 3(а)). Толщина одного слоя наночастиц в оболочке составляет 16±2 нм, и

превышает средний размер самих наночастиц. Это указывает на то, что наночастицы формируют слой с высокой плотностью упаковки (рис. 3(б)).

Третья глава посвящена оценке воздействия наночастиц магнетита на живые системы на клеточном и тканевом уровнях, а также изучению МР контрастирования наночастиц магнетита и магнитолипосом.

Оценка биобезопасности наночастиц магнетита была проведена на культурах нейтрофильных гранулоцитов, для которых отмечены разные варианты интернализации наноматериалов (кавеол-зависимое, рафт-зависимое, клатрин-зависимое). В системе *in vitro* выявлена низкая цитотоксичность малых концентраций магнетита в отношении нейтрофильных гранулоцитов. В то же время часовая инкубация с наночастицами в концентрации 3.25 мг/мл приводит к падению жизнеспособности клеток ниже 50%. Помимо выраженного летального эффекта высоких концентраций магнетита выявлены существенные морфологические изменения клеток крови.

Для исследования воздействия магнетита на тканевом уровне оценивали накопление наночастиц, а также морфологические изменения тканей при внутрибрюшинном введении коллоидов крысам с перевитой опухолью рака печени РС-1. Основные изменения при внутрибрюшинном однократном и многократном введении магнетита представлены обратимыми дистрофическими и ишемическими повреждениями клеток паренхиматозных органов и нарушениями лимфо- и кровообращения, что позволяет сделать вывод о низком цитотоксическом эффекте полученных наночастиц магнетита. МРТ исследование показало, что сигнальные характеристики привитых опухолей у лабораторных животных контрольных и исследуемых групп идентичны, опухоли изоинтенсивны на T2 и T1 взвешенных изображениях.

Анализируя вышесказанное, можно сделать заключение о низкой цитотоксичности малых концентраций магнетита (0,325 мг/мл) в отношении нейтрофильных гранулоцитов. Кроме того было установлено, что при внутрибрюшинном методе введения максимальное количество наночастиц накапливается в лимфатических узлах брюшной полости, что обусловлено выполнением ими барьерной функции и поглощением наночастиц макрофагами.

В третьей главе также представлены результаты сравнительного исследования зависимости интенсивности МР сигнала магнитолипосом и зольей наночастиц от их концентрации для оценки возможности применения полученных магнитолипосом с целью усиления контрастирования *in vivo*.

Усиление контраста области интереса на МР изображениях обусловлено взаимодействием магнитных наночастиц с окружающими их протонами, которые являются МР-активными ядрами в клинической МРТ. Полученные магнитолипосомы имеют в составе наночастицы магнетита и молекулы фосфолипидов. Для проверки влияния молекул фосфолипидов на интенсивность МР сигнала были получены образцы незагруженных магнетитом липосом и образцы коллоидов магнетита с различной концентрацией (рис. 4), которые были исследованы на МР томографе. Концентрация липидов в микропробирках составляет 0,13; 0,26; 0,52; 1,05; 2,1 и 4,2 мг/мл, а наночастиц магнетита 0,005; 0,009; 0,021; 0,042; 0,084; 0,065 мг/мл.

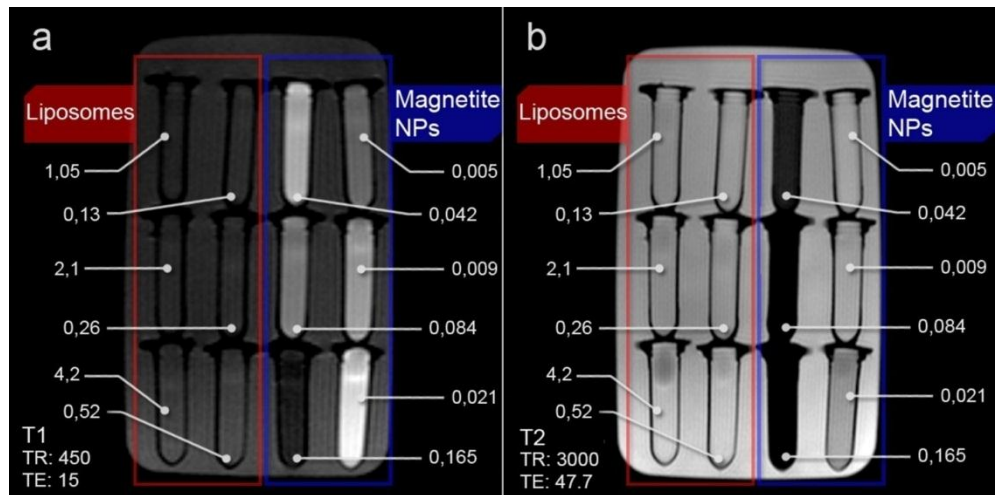


Рис. 4. МР изображения образцов, содержащих немагнитные липосомы (контроль; концентрация липидов указана в мг/мл) и наночастицы магнетита в различной концентрации (концентрация магнетита указана в мг/мл). (а) – T1 взвешенное изображение; (б) – T2 взвешенное изображение.

Эти значения соответствуют концентрациям фосфолипидов и магнитных наночастиц в магнитолипосомах, которые были использованы для экспериментов *in vivo*. Из полученных МР изображений видно, что молекулы фосфолипидов при данных концентрациях не вносят вклад в интенсивность сигнала (рис. 4).

Также были приготовлены растворы магнитолипосом различной концентрации (0,005; 0,009; 0,021; 0,042; 0,084; 0,065 мг/мл в пересчете на магнетит) и исследовано их МР контрастирование. На рисунке 5 показаны T1 и T2 взвешенные изображения микропробирок, содержащих суспензии магнитолипосом.

Зависимость интенсивности МР сигнала от концентрации наночастиц магнетита на T1 взвешенных изображениях представлена на рисунке 6(a) и имеет немонотонный характер как в случае отдельных наночастиц, так и в случае наночастиц в составе магнитолипосом. Измеренные времена релаксации зависят

от концентрации коллоида магнетита также нелинейно. По нашему предположению немонотонная зависимость интенсивности МР сигнала от концентрации наночастиц является следствием того, что изображения, полученные на медицинском МР томографе, строятся не из вычисленных «чистых» времен релаксации T1 и T2, а являются взвешенными по этим параметрам, то есть зависят и от T1, и от T2, и от протонной плотности, но в разной степени.

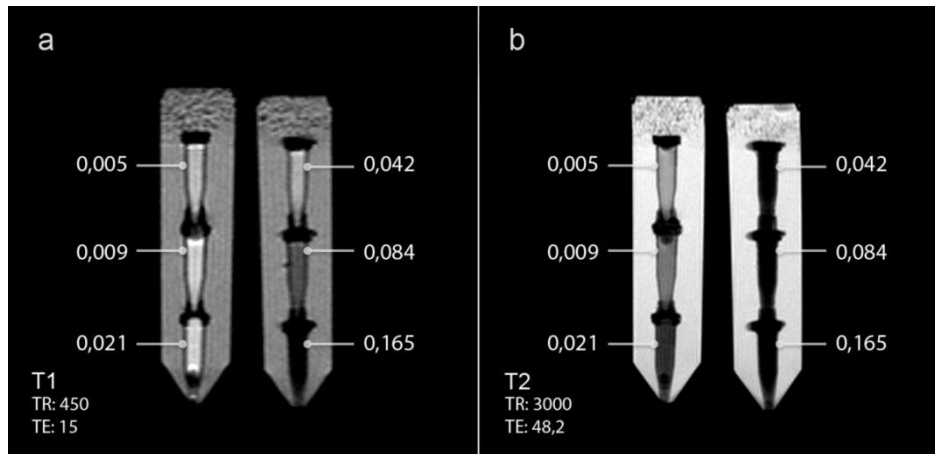


Рис. 5. МР изображения образцов, содержащих магнитные липосомы в различной концентрации. Цифрами показана концентрация наночастиц магнетита (мг/мл). Общее содержание липидов в наиболее концентрированном образце (содержащем 0,165 мг/мл магнетита) соответствует ~ 4.2 мг/мл). (а) – T1 взвешенное изображение; (б) – T2 взвешенное изображение.

На рисунке 6 также видно, что магнитолипосомы, обеспечивают меньшее время поперечной релаксации (T2) протонов по сравнению с наночастицами. Следовательно, на T2 взвешенных изображениях магнитолипосомы контрастируют более эффективно, чем гидрозолю наночастиц. Так как наночастицы магнетита используются в основном для усиления контраста области интереса именно на T2 взвешенных изображениях, то очевидно, что магнитолипосомы, в данном случае, в качестве контрастирующего агента более эффективны по сравнению с наночастицами магнетита. К тому же к преимуществам магнитолипосом относятся более высокая биосовместимость и возможность модификации их поверхности высокоспецифичными лигандами для адресной доставки, что в сочетании с более эффективным контрастированием в T2 позволяет обеспечить значительное преимущество использования магнитолипосом по сравнению с гидрозолю магнетита.

С другой стороны, как уже отмечалось, коллоид наночастиц магнетита контрастирует на T1 взвешенных изображениях эффективнее, чем

магнитолипосомы. Также видно, что в случае коллоида магнетита более выражена зависимость интенсивности МР сигнала от концентрации контрастирующего агента. Мы предполагаем, что этот эффект может быть использован для оценки распределения наночастиц магнетита *in vivo*.

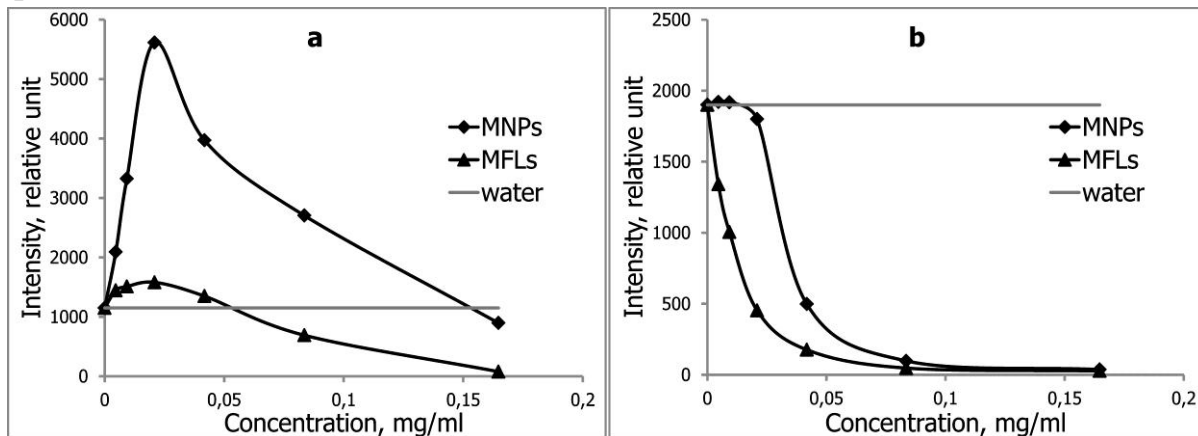


Рис. 6. Зависимость интенсивности МР-сигнала от концентрации наночастиц магнетита (квадратные маркеры) и магнитолипосом (треугольные маркеры). Концентрация в расчете на магнетит. (а) – T1 взвешенное изображение; (б) – T2 взвешенное изображение.

Полученные магнитолипосомы были использованы для *in vivo* контрастирования раковой опухоли путем интратуморального введения объема суспензии в количестве 10% от объема опухоли. МР изображения опухоли после введения магнитолипосом и контроля приведены на рисунке 7.

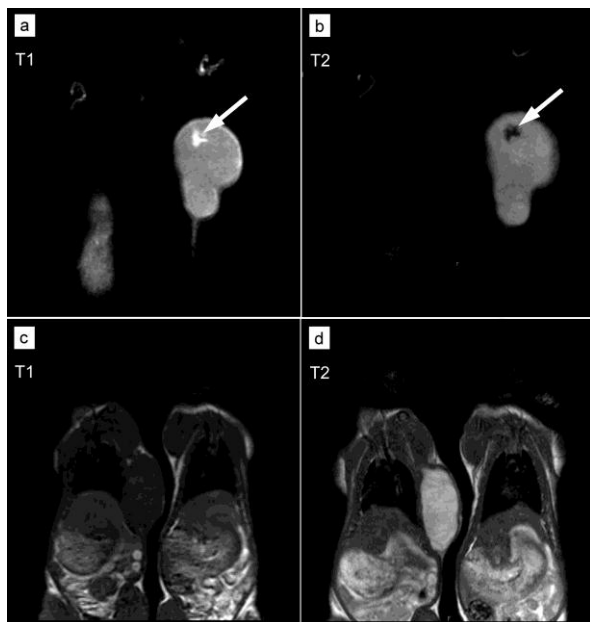


Рис.7. МР-изображение крыс с перевитым раком почки: а), б) T1 и T2 взвешенные изображения опухоли крысы (крыса на рис. с и d, расположенная справа) с интратуморально введенным раствором магнитолипосом (0.25 мг/мл в расчете на магнетит) за 1 час до проведения МРТ исследования; с), d) T1 и T2 взвешенные изображения опухоли контрольной крысы (крыса слева).

Четвертая глава посвящена изучению свойств полиэлектролитных микрокапсул, содержащих наночастицы магнетита. Необходимо отметить, что

включение в структуру оболочек микрокапсул наночастиц магнетита позволяет осуществлять их перемещение в градиенте магнитного поля и ориентацию в однородном магнитном поле. В качестве модели для изучения магнитных свойств данных микрокапсул и распределения наночастиц в их оболочке использовали планарные покрытия полиэлектролит/магнитные наночастицы, сформированные аналогичным образом на подложках монокристаллического кремния. Для получения нанокомпозитных покрытий на поверхность кремниевой пластины последовательно адсорбировали слои отрицательно заряженных наночастиц оксида железа и катионного полиэлектролита полиаллиламина гидрохлорида. Полученные нанокомпозитные покрытия исследовали методами атомно-силовой микроскопии, магнитно-силовой микроскопии (МСМ), вибрационной магнитометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния. Использование МСМ было необходимо для определения размера и формы магнитных агрегатов, а также их положения на поверхности структур.

Расчет намагниченности насыщения M_s проводили по кривым $M(H)$. Для определения M_s были использованы масса и объем наночастиц оксида железа в нанокомпозитных покрытиях (см. таблицу 1).

Таблица 1.

№ образца (число слоев оксида железа (N))	M_s (193 K)		M_s (473 K)		μ (193K)	μ (473K)
	(emu/cm ³)	(emu/г)	(emu/cm ³)	(emu/г)		
1 (6)	286.91	57.38	128.92	25.78	5.4	2.6
2 (11)	361.03	72.35	110.05	22.05	5.6	3.1
3 (16)	318.59	63.97	286.14	57.45	4.8	3.9

На рисунке 8(а)-(с) показана зависимость намагниченности образцов от приложенного магнитного поля при 193 и 473К. Кривые $M(H)$, представленные на рисунке 8 имеют типичную сигмоидальную форму с очень малой шириной петли гистерезиса в области слабого приложенного поля.

Данные, представленные в таблице 1, отражают немонотонную зависимость M_s от числа слоев наночастиц оксида железа при 193К, которая имеет максимум (72.35 emu/г.) при 11 слоях наночастиц оксида железа. Это значение хорошо согласуется с данными, полученными для наночастиц магнетита [13], и меньше значения M_s для объемного материала [14, 15].

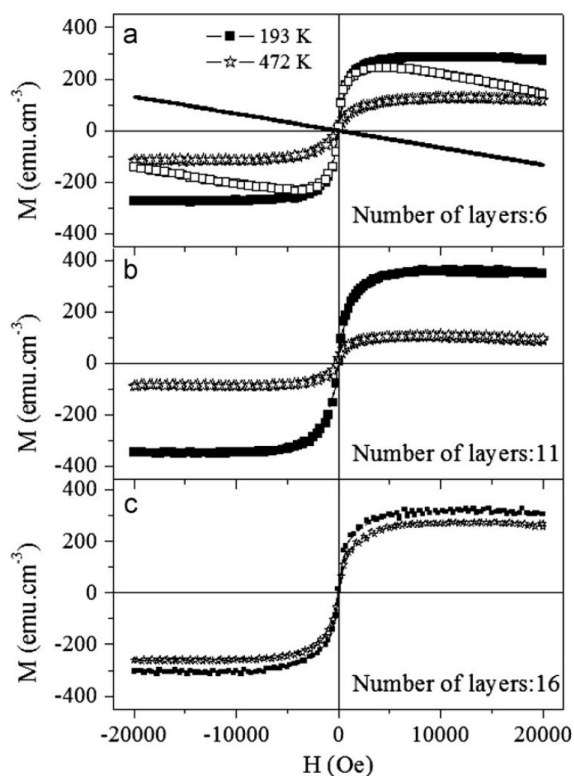


Рисунок 8. Зависимости $M(H)$ образцов при 193 и 473 К с различным числом слоев.

(а) - 6 слоев со структурой PEI(оксид железа/PAH)₆,

(б) - 11 слоев со структурой PEI(оксид железа/PAH)₁₁,

(с) - 16 слоев со структурой PEI(оксид железа/PAH)₁₆.

(□) показывает намагниченность магнитной пленки и подложки при 193 К. Линия показывает, намагниченность диамагнитной подложки при температуре 193 К.

(■) показывает намагниченность ферромагнитных пленок на 193 К.

Звезды показывают намагниченность ферромагнитных пленок при 473 К.

В таблице 1 представлены значения магнитной проницаемости μ , полученные из кривой $M(H)$ для разных температур при 193 К и 473 К. Видно, что зависимость магнитной проницаемости образцов от числа слоев оксида железа при 193 К имеет немонотонный характер и обнаруживает максимум при 11 слоях наночастиц. Однако температурная обработка нанокомпозитных покрытий приводит к уменьшению их магнитной проницаемости, величина изменения которой монотонно уменьшается с ростом числа циклов адсорбции наночастиц магнетита. Эту зависимость можно объяснить с помощью анализа данных спектроскопии комбинационного рассеяния, которые показывают, что магнетит в композитном покрытии на воздухе частично окисляется в маггемит. При этом отношение содержания маггемита к магнетиту, зависит от числа слоев в покрытии обратно пропорционально. Эти результаты должны быть приняты во внимание при формировании структур методом полиионной сборки, содержащих наночастицы оксида железа, например, магнитных микрокапсул.

Были сформированы биосовместимые композитные микрокапсулы на основе поли-L-аргинина и натриевой соли декстран сульфата, содержащие три слоя наночастиц магнетита в составе оболочки. Было проведено *in vitro* исследование МР контрастирования суспензий микрокапсул в физиологическом растворе при их различных концентрациях. На рисунке 9(а,б) показаны T1 и T2 взвешенные томограммы пробирок, содержащих коллоид магнетита (левый столбец) и водную

суспензию магнитных полиэлектролитных микрокапсул (правый столбец) в диапазоне концентраций 0,002 – 2,7 мг/мл в расчете на магнетит. Из рисунка видно, что микрокапсулы не контрастируют на МР изображениях, но при концентрациях выше 1 мг/мл начинают создавать артефакты. В ходе эксперимента проводили ферментативную деградацию оболочек полученных микрокапсул путем добавления трипсина, который разрушает пептидные связи поли-L-аргинина и, следовательно, оболочку микрокапсулы. T1 и T2 взвешенные томограммы разрушенных микрокапсул изображены на рисунке 9(а,б, средний столбец). При деградации оболочек микрокапсул наночастицы, находящиеся в них, высвобождаются и начинают контрастировать на МР изображениях. Исследование суспензии высвобожденных наночастиц методом ДРС показало, что наночастицы в процессе формирования/разрушения микрокапсул агрегировали не значительно. Это подтверждается данными МРТ (рис.9(а,б), средний столбец) и ПЭМ (рис.10(а,б)).

Таким образом, продемонстрирована возможность оценки деградации полиэлектролитных микрокапсул, содержащих наночастицы магнетита, *in vitro* и *in vivo*, используя МРТ.

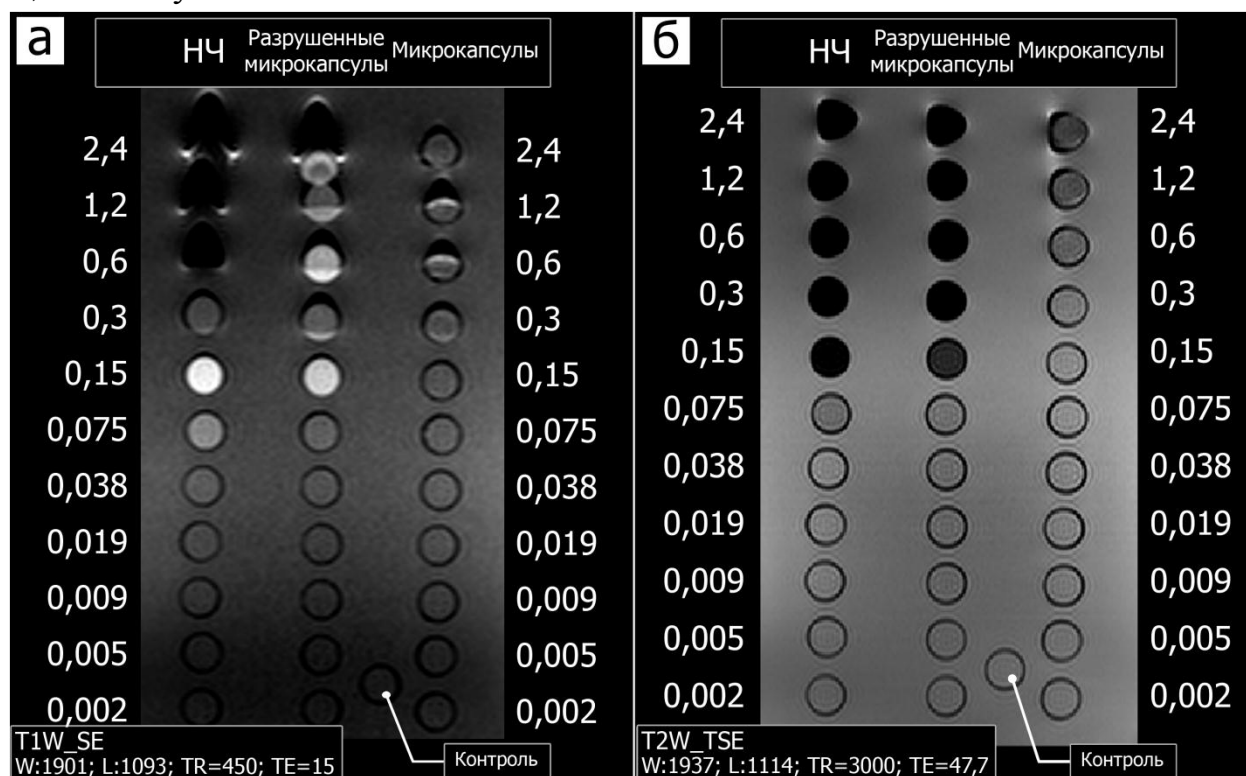


Рис. 9. (а), (б) - T1 и T2 взвешенные МР изображения коллоидов магнетита, и суспензий не разрушенных и разрушенных трипсином магнитных полиэлектролитных биodeградируемых микрокапсул в различной концентрации (концентрация указана в мг/мл, в расчете на содержание магнетита).

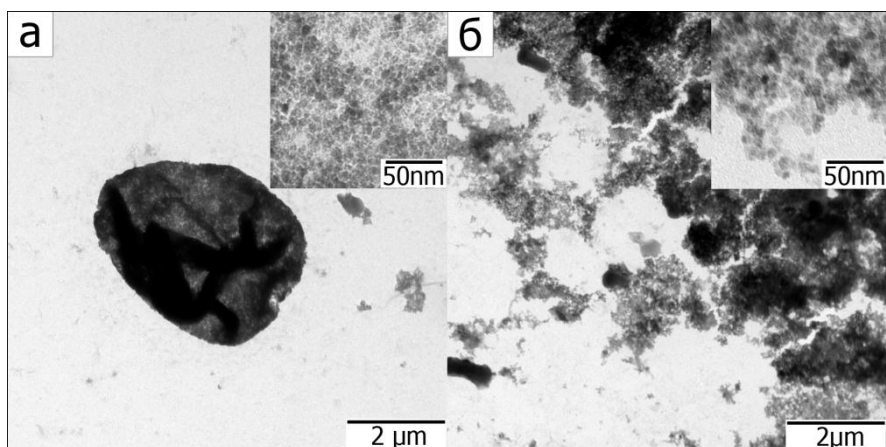


Рис.10. Изображения, полученные методом ПЭМ: (а) – микрокапсула, содержащая наночастицы магнетита (вставка - наночастицы в оболочке микрокапсулы); (б) – разрушенная трипсином микрокапсула при различном увеличении.

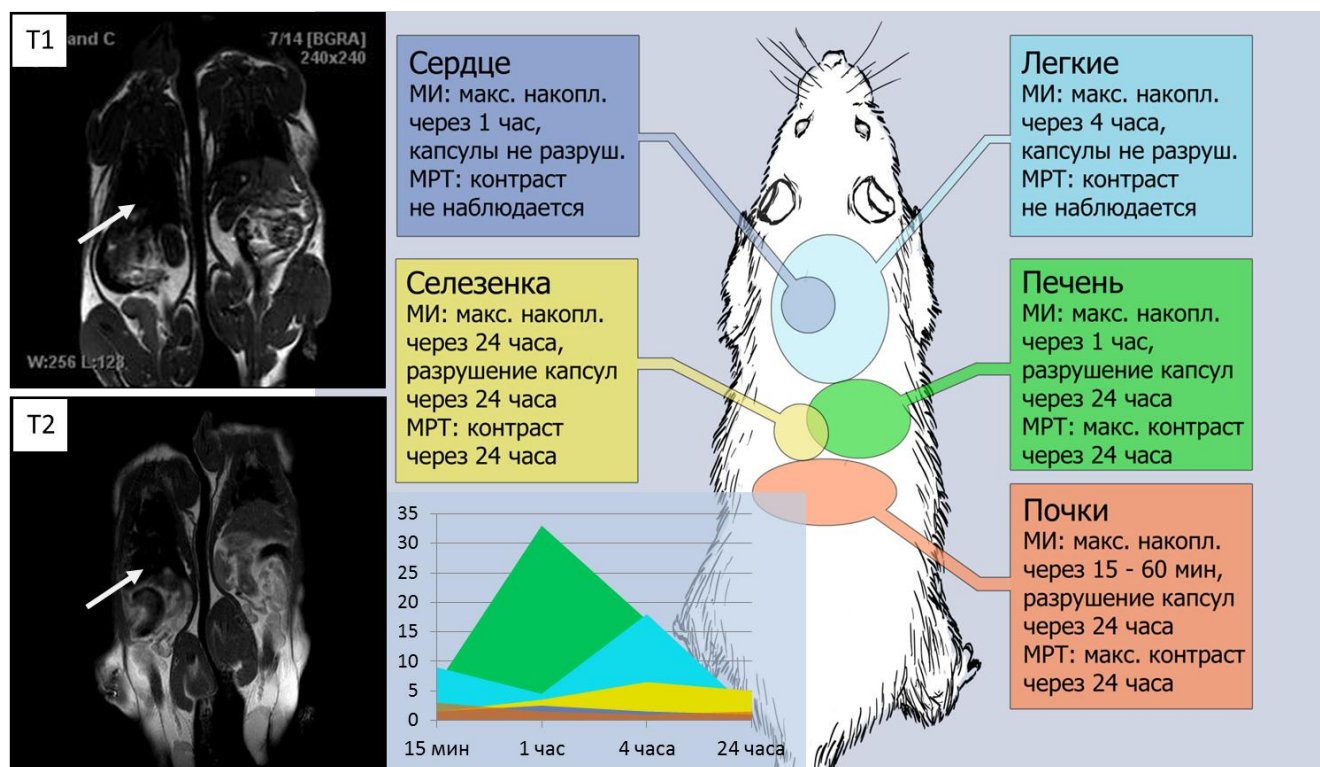


Рис.11. Схема, показывающая время, через которое наблюдается максимальное накопление микрокапсул по данным морфологического исследования (МИ), их целостность и время, через которое наблюдается контрастирование высвобожденных наночастиц в легких, сердце, селезенке, печени и почках при внутривенном введении суспензии микрокапсул. Слева МР изображения крыс через сутки после введения магнитных микрокапсул (левая крыса, правая крыса – контроль), контрастирующая область обозначена стрелками.

Было изучено биораспределение магнитных композитных биodeградируемых микрокапсул с целью оценки возможной токсичности,

накопления и биораспределения исследуемых наноструктур при внутривенном введении у лабораторных животных без перевитых опухолей.

По данным гистологии при внутривенном введении микрокапсул в дозировке $2,5 \times 10^9$ капсул/кг (в расчете на магнетит - 15 мг/кг) в течение первого часа (точки 15 мин, 60 мин) основное накопление отмечается в почках, печени и сердце, через 4 часа - в легких, через 24 часа - в селезенке. При этом разрушение микрокапсул наблюдалось только в селезенке, почках и печени через 24 часа. Представленные выше результаты коррелируют с результатами МРТ исследований, согласно которым сразу после введения микрокапсулы на МР изображениях не контрастируют, т. к. они еще не разрушены (рис. 11). При разрушении микрокапсул в селезенке, почках и печени высвобожденные наночастицы магнетита начинают контрастировать на МР изображениях. При этом максимальные морфологические изменения наблюдались через 1 час в сердце и печени, через 4 часа в легких и селезенке, через 24 часа в почках. Через месяц наблюдается нормальное строение почек, сердца и печени. В селезенке через месяц в красной пульпе пигмент исчезает, в белой пульпе остается. Выраженность аллергической реакции в легочной ткани нарастает в течение недели, с вовлечением бронхов и сосудов.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

Список использованных источников:

1. Lauterbur P. C. et al. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance //Nature. – 1973. – Т. 242. – №. 5394. – С. 190-191.
2. P.A. Rinck, Magnetic resonance in medicine. The basic textbook of the European Magnetic resonance in medicine // Wiley-Blackwell – 2001. – 4 edition.
3. Xiong R. et al. Towards theranostic multicompartiment microcapsules: in-situ diagnostics and laser-induced treatment //Theranostics. – 2013. – Т. 3. – №. 3. – С. 141.
4. Ito A. et al. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles //Journal of bioscience and bioengineering. – 2005. – Т. 100. – №. 1. – С. 1-11.
5. Berry C. C., Curtis A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine //Journal of physics D: Applied physics. – 2003. – Т. 36. – №. 13. – С. R198.
6. Qiao R., Yang C., Gao M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications //Journal of Materials Chemistry. – 2009. – Т. 19. – №. 35. – С. 6274-6293.
7. Tarahovsky Y. S. “Smart” liposomal nanocontainers in biology and medicine //Biochemistry (Moscow). – 2010. – Т. 75. – №. 7. – С. 811-824.
8. del Mercato L. L. et al. Biological applications of LbL multilayer capsules: From drug delivery to sensing //Advances in colloid and interface science. – 2014. – Т. 207. – С. 139-154.
9. Martina M. S. et al. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging //Journal of the American Chemical Society. – 2005. – Т. 127. – №. 30. – С. 10676-10685.
10. Massart R. Preparation of magnetite nanoparticles //IEEE Trans Magn. – 1981. – Т. 17. – №. 1. – С. 247-250.
11. Gabizon A., Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – Т. 85. – №. 18. – С. 6949-6953.
12. Peng A., Straubinger R. M., Balu-Iyer S. V. Phosphatidylinositol containing lipidic particles reduces immunogenicity and catabolism of factor VIII in hemophilia a mice //The AAPS journal. – 2010. – Т. 12. – №. 3. – С. 473-481.
13. Asmatulu R. et al. Synthesis, characterization and targeting of biodegradable magnetic nanocomposite particles by external magnetic fields //Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2005. – Т. 292. – С. 108-119.
14. Woo K. et al. Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles //Chemistry of Materials. – 2004. – Т. 16. – №. 14. – С. 2814-2818.

15. Kim T., Shima M. Reduced magnetization in magnetic oxide nanoparticles //Journal of applied physics. – 2007. – Т. 101. – №. 9. – С. 09M516.

Основные результаты и выводы:

1. В работе разработаны физико-химические подходы, позволяющие реализовать *in vitro* и *in vivo* визуализацию с помощью МРТ липосом и нанокompозитных биodeградируемых микрокапсул, содержащих наночастицы магнетита с заданным контрастированием на T1 и T2 взвешенных изображениях, а также проведено сравнение их контрастирующих свойств с гидрозолем магнетита. Показано, что интенсивность сигнала на T1 взвешенных изображениях зависит от концентрации исследуемых гидрозолей магнетита, магнитолипосом и магнитных микрокапсул не монотонно, магнитолипосомы по сравнению с гидрозолем магнетита эффективнее контрастируют на T2 взвешенных изображениях, а магнитные микрокапсулы позволяют варьировать контрастирующие свойства в широких пределах.
2. Предложена схема и реализована установка, позволяющая синтезировать гидрофильные наночастицы магнетита в инертной атмосфере, особенностью которой является то, что управление потоками реагентов происходит за счет изменения давления инертного газа в системе.
3. Показано, что с ростом числа циклов адсорбции в нанокompозитном покрытии полиэлектролит/наночастицы оксида железа наблюдается изменение морфологии поверхности, проявляющееся в увеличении шероховатости, вызванном ростом агрегатов наночастиц оксида железа и уменьшением расстояния между ними. Температурная обработка нанокompозитных покрытий, содержащих наночастицы магнетита, приводит к уменьшению их магнитной проницаемости, величина изменения которой уменьшается с увеличением толщины покрытия и содержания магнетита. Такое поведение магнитной проницаемости объясняется тем, что соотношение магнетита и маггемита в покрытии при окислении наночастиц магнетита зависит от толщины покрытия.
4. Определен диапазон концентраций гидрозолей магнетита при их среднем размере 13 ± 3 нм (0,005 – 0,3 мг/мл для T1, 0,02 – 0,6 мг/мл для T2) для эффективного использования в МРТ. Максимальное значение концентрации ограничено величиной эффективной магнитной проницаемости среды, увеличение которой вызывает искажения томограммы, а минимальное – величиной магнитного момента отдельной наночастицы.

- 5 Выявлена низкая цитотоксичность *in vitro* малых концентраций магнетита (0,325 мг/мл, количество клеток – 10^6 клеток/мл) в отношении нейтрофильных гранулоцитов. В то же время часовая инкубация с наночастицами в концентрации 3.25 мг/мл приводит к падению жизнеспособности клеток ниже 50 %. Помимо выраженного цитотоксического эффекта высоких концентраций магнетита выявлены существенные морфологические изменения клеток крови.
- 6 Установлено, что основные изменения при внутрибрюшинном однократном и многократном введении наночастиц магнетита крысам с перевитой опухолью печени РС-1 представлены обратимыми дистрофическими и ишемическими повреждениями клеток паренхиматозных органов и нарушениями лимфо- и кровообращения, что позволяет сделать вывод о низком цитотоксическом эффекте исследованных наночастиц магнетита. Показано, что при внутрибрюшинном методе введения максимальное количество наночастиц накапливается и оседает в лимфатических узлах брюшной полости.
- 7 Получены моноламеллярные липосомы с размером 154 ± 47 нм на основе яичного фосфатидилхолина, содержащие МНЧ во внутреннем объеме с эффективностью загрузки 4,4%. Определена минимальная концентрация магнитолипосом (0,005 мг/мл по содержанию магнетита), при которой наблюдается контрастирование. При интратуморальном введении магнитолипосом обнаружено усиление контраста области интереса (ROI) на T1 и T2 взвешенных томограммах, и определен объем данной области и примерная концентрация в ней магнитолипосом.
- 8 Показано, что МР контрастирование микрокапсул на основе полиаргинина и натриевой соли декстран сульфата, содержащих наночастицы магнетита, увеличивается с уменьшением концентрации наночастиц в оболочках микрокапсул. Установлено, что вышеописанные микрокапсулы, содержащие наночастицы магнетита в высокой концентрации, первоначально не контрастируют в МРТ. Однако, при их ферментативной деградации *in vitro* и *in vivo* наблюдается контрастирование, которое связано с увеличением среднего расстояния между наночастицами магнетита.
- 9 При внутривенном введении нанокompозитных микрокапсул (диаметр 3-5 мкм) в дозировке $2,5 \times 10^9$ капсул/кг (в расчете на магнетит - 15 мг/кг) у лабораторных животных с помощью гистологических методов установлено, что максимальное их накопление в почках наблюдается через 15 минут после введения, в легких -

через 4 часа, в печени и сердце – через 1 час, а в селезенке - через 24 часа. Максимальное контрастирование области интереса на МР изображениях при разрушении микрокапсул наблюдается через 24 часа после внутривенного введения в селезенке, почках и печени.

Основные результаты диссертации изложены в работах:

Статьи:

1. Marchenko I., Yashchenok A., German S., Inozemtseva O., Gorin D., Bukreeva T., Mohwald H. and Skirtach A. Polyelectrolytes: Influence on evaporative self-assembly of particles and assembly of multilayers with polymers, nanoparticles and carbon nanotubes //Polymers. – 2010. – Т. 2. – №. 4. – С. 690-708.
2. Dincer I., Tozkoparan O., German S.V., Markin A.V., Yildirim O., Khomutov G.B., Gorin D.A., Venig S.B., Elerman Y. Effect of the number of iron oxide nanoparticle layers on the magnetic properties of nanocomposite LbL assemblies //Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2012. – Т. 324. – №. 19. – С. 2958-2963.
3. Герман С.В., Иноземцева О.А., Маркин А.В., Метвалли Х., Хомутов Г.Б., Горин Д.А. Синтез гидрозолей магнетита в инертной атмосфере //Коллоид. журн. – 2013. – Т. 75. – №. 4. – С. 534-537.
4. Герман С.В., Иноземцева О.А., Наволокин Н.А., Пудовкина Е.Е., Зуев В.В., Волкова Е.К., Бучарская А.Б., Плескова С.Н., Маслякова Г.Н., Горин Д.А. Синтез гидрозолей магнетита и оценка их воздействия на живые системы на клеточном и тканевом уровнях при использовании МРТ и морфологических методов исследования // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т. 8. – №. 7-8. – С. 118-123.
5. German S.V., Navolokin N.A., Kuznetsova N.R., Zuev V.V., Inozemtseva O.A., Anis'kov A.A., Volkova E.K., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Fakhrullin R.F., Terentyuk G.S., Vodovozova E.L., Gorin D.A. Liposomes loaded with hydrophilic magnetite nanoparticles: Preparation and application as contrast agents for magnetic resonance imaging //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2015. – Т. 135. – С. 109-115.

Тезисы конференций:

6. Emulsion application for changing of continuous phase of magnetite nanoparticle colloid [Текст] / S.V. German, A.V. Markin, G.Yu. Yurkov, G.B. Khomutov, D.A. Gorin // Proceedings of the 3rd International Workshop on "Nanoparticles, Nanostructured Coatings and Microcontainers: Technology, Properties, Applications". –Antalya, Turkey, 2011. – С. 37–38.

7. Получение коллоидов наночастиц магнетита в полярном и неполярном растворителях [Текст] / С.В. Герман, А.В. Маркин, Д.А. Горин, С.Н. Штыков // Тез. I Всероссийский симпозиум по поверхностно-активным веществам «От коллоидных систем к нанохимии», Казань, 28 июня – 1 июля 2011 г. — Казань, 2011. – С. 42.
8. Синтез гидрозолей магнетита для биомедицинских применений [Текст] / С.В. Герман, О.А. Иноземцева, А.В. Маркин, Г.Б. Хомутов, Р.Ф. Фахруллин, Д.А. Горин // Материалы конференции «Post-Genome methods of analysis in biology and laboratory and clinical medicine». –Казань, Россия, 2012. – С. 270–271.
9. Synthesis and biomedical applications of magnetite hydrosols [Текст] / S.V. German, О.А. Inozemtseva, N.A. Navolokin, N.R. Kuznetsova, V.V. Zuev, E.K. Volkova, A.B. Bucharskaya, G.N. Maslyakova, R.F. Fakhrullin, E.V. Vodovozova, D.A. Gorin, // Proceedings of the 5th International Workshop on «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications». – Ghent, Belgium, 2014. – С. 47-48.
10. Biodistribution and morphological changes in the internal organs and tumors in laboratory rats at intravenous injection of citrate stabilized magnetite nanoparticles [Текст] / N.A. Navolokin, S.V. German, A.B. Bucharskaya, V.V. Zuev, G.N. Maslyakova, G.S. Terentyuk, D.A. Gorin // Proceedings of the 6th International Workshop on "Nanoparticles, Nanostructured Coatings and Microcontainers: Technology, Properties, Applications". –Saratov, Russia, 2015. – С. 48.
11. Where are nanocomposite capsules after in vivo injections and how navigate and activate them? [Электронный ресурс] / S. German, N. Navolokin, O. Bessonova, V. Zuev, M. Lomova, A. Bucharskaya, G. Maslyakova, G. Terentyuk, D. Gorin, G. Sukhorukov // 8th International Conference on Materials for Advanced Technologies of the Materials Society of Singapore and 16th IUMRS - International Conference in Asia together with 4th Photonics Conference 2015 (ICMAT2015 & IUMRS-ICA2015). – Singapore, 2015, 28 June –3 July.
http://www.meetmatt.net/mrss/icmat2015/pubAbsBrowse.asp?browseBy=oral&ssID_o=4_13&daySel=2&showAbs=yes&button=Submit