

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЛОЖНОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА КАК СУБСТАНЦИИ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОГО КОНТРАСТНОГО СРЕДСТВА

А. Г. Аюпджанов¹, А. И. Сергеев², Э. В. Манвелов¹, А. В. Семейкин¹,
В. Ю. Науменко¹, В. О. Панов¹, И. В. Быков¹, Н. Л. Шимановский¹

Описано получение стабильного коллоидного раствора наночастиц оксида железа, которые позволяют увеличить точность диагностической информации магнитно-резонансной томографии за счет одновременного влияния на относительную контрастность тканей на T1- и T2-взвешенные изображения. Наблюдалась визуализация более мелких сосудов головного мозга после внутривенного введения взрослым крысам 0,1 мл данного раствора с содержанием контрастного железа 5 мг. Парамагнитные свойства наночастиц оксидов железа изучали методом протонной релаксации, а их размер определяли с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии. Токсичные свойства наночастиц определяли по воздействию на культуру клеток HeLa с помощью МТТ-теста. Полученный коллоидный раствор на основе суперпарамагнитных частиц оксида железа со средним диаметром наночастиц 8,2 нм можно рекомендовать для создания лекарственной формы нового магнитно-резонансного контрастного средства — феротраст.

Ключевые слова: наночастицы оксида железа, цитотоксичность, магнитно-резонансная томография

ВВЕДЕНИЕ

Применение нанотехнологий в фармакологии — одно из перспективных и интенсивно развивающихся направлений современной науки и технологии как в России, так и за рубежом. Уникальные свойства вещества в наносостоянии (электромагнитные, суперпарамагнитные и биоинертные) дают возможность вести поиск новых веществ, обладающих не только контрастно-диагностическими свойствами, но и одновременно способствующих лечебным мероприятиям, направленным против новообразований. Наличие специфических физических, химических и биологических свойств у наночастиц объясняется соизмеримостью геометрических параметров материала с основным корреляционным размером выбранного эффекта и возрастающей ролью поверхностных атомов и взаимодействий. Например, соизмеримость размера наночастицы и магнитного домена приводит к появлению явления суперпарамагнетизма. Суперпарамагнетизм — квазипарамагнитное поведение веществ во внешнем магнитном поле, состоящих из очень малых ферроили ферримагнитных частиц, слабо взаимодействующих

друг с другом и ведущих себя во внешнем магнитном поле как отдельные атомы. Гистерезис в таких структурах отсутствует. Внешнее поле ориентирует магнитные моменты частиц по полю без изменения направления самих частиц, в то время как у парамагнитных газов магнитные моменты переориентируются вместе с их носителями — молекулами. Необходимым условием существования суперпарамагнетизма является соизмеримость геометрического размера частицы с размером магнитного домена (3 – 10 нм), при этом удается избежать влияния междоменных стенок (стенок Блоха). Этот эффект возможен только в системах на основе наночастиц. При воздействии внешнего магнитного поля каждый отдельный магнитный домен принимает то же направление, что и внешнее поле. Намагниченность суперпарамагнетиков во много раз больше намагниченности обычных парамагнетиков. Отсутствие магнитного гистерезиса приводит к тому, что потери при поглощении и испускании исследуемой средой энергии внешнего магнитного поля сводятся к минимуму. В связи с этим их способность уменьшать время релаксации исследуемых систем, т.е. оказывать контрастирующий эффект, резко возрастает [3, 5].

Значительная доля поверхностных атомов, имеющих некомпенсированные связи, определяет повышенную активность наночастицы, величину поверхностной энергии в ее химическом потенциале. Поскольку наночастицы являются, по сути, неравновесными

¹ Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии, кафедра экспериментальной и теоретической физики медицинского-биологического факультета РГМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, 117437, ул. Островитянова, 1. E-mail: shiman@rsmu.ru.

² Лаборатория ЯМР НИИ химической физики РАН, Москва.

системами для их биологического использования необходимо находить способы стабилизации предлагаемых наноструктур при сохранении их уникальных фармакологических свойств. Ещё одной важнейшей проблемой при создании новых лекарственных средств является так называемая «размерная токсичность», объяснение которой непосредственно вытекает из особенности структуры наночастицы. Развитая поверхность нанообъектов, в особенности, металлических, может приводить к разрыву молекулярной структуры биомакромолекул. Исследованию возможной токсичности нанообъектов, а также методам её нивелирования посвящена значительная часть предлагаемой работы.

Наночастицы сложного оксида железа магнетита — Fe_3O_4 являются наиболее подходящим магнитным материалом для биомедицинских исследований. С его помощью можно создавать препараты для контрастирования, разрабатывать способы лечения онкологических больных методом магнитной термотерапии, технологию для мечения стволовых клеток с целью контроля их движения в организме и трансформации в специализированные клетки тканей и органов. Движением таких наночастиц можно управлять посредством наложения внешнего магнитного поля и локализовать их в необходимой области или органе. Это касается как процесса доведения лекарственного препарата до определенного органа, так и удержания его в этом органе. Перспективность применения сложного оксида железа определяется возможностью создания на его основе стабильной коллоидной системы и наличием значительного пула элемента железа в крови человека [2].

Ядро наночастицы магнетита представляет оксид трехвалентного железа, покрытый слоем оксида двухвалентного железа. Наличие у наночастиц оксида железа внутреннего незаполненного уровня ($3d_6$), на котором находятся 4 некомпенсированных электрона, обладающих спиновым магнитным моментом, приводит к появлению суммарного магнитного момента, равного 4-м магнетонам Бора. При этом между электронами незаполненных соседних атомов возникает сильное электростатическое взаимодействие, называемое обменным. В случае мелких частиц, порядка 5 – 10 нм, обменные силы существенно ослабляются за счет теплового движения, и вещество переходит в суперпарамагнитное состояние. Для однодоменных частиц перемагничивание осуществляется за счет поворота вектора намагниченности. Таким образом, для создания оптимального контрастного средства необходимо получить стабильный коллоидный раствор на основе наночастиц сложного оксида железа с размером 5 – 10 нм [1].

Наиболее близким, с практической точки зрения, применением сложного оксида железа является возможность создания на его основе современного контрастного средства «Феротраст» для МРТ-диагностики.

Новое средство будет превосходить используемые в настоящий момент препараты, в основном гадолиний-содержащие, по основным функциональным характеристикам — контрастным свойствам, безопасности, себестоимости.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предлагаемый нами в качестве действующего вещества сложный оксид железа — магнетит (Fe_3O_4) получали химическим методом при осаждении магнетита щелочью из водного раствора солей двухвалентного и трехвалентного железа в строго выбранных условиях таким образом, чтобы размер частиц в коллоидном растворе не превышал 5 – 9 нм. В качестве основной химической реакции для получения наполнителя магнитной жидкости выбрана так называемая реакция Элмора [8]. Метод получения наночастиц с помощью реакции Элмора хорошо описан в литературе, однако нерешенной задачей остается поиск нужного поверхностно-активного вещества, позволяющего получать наночастицы, совместимые с биологической тканью и одновременно сохраняющие достаточную релаксационную активность [8, 10].

Выбор метода и режимов получения коллоидного раствора на основе наночастиц практически полностью определяет его конечные физико-химические свойства. Существуют две методики получения высокодисперсного магнетита по реакции Элмора — с помощью добавления гидрата аммония и добавления гидроксида натрия. Однако существенным недостатком второго метода является тот факт, что добавление гидроксида натрия следует проводить при повышенной температуре, что приводит к увеличению размера наночастиц. Количество и механизм добавления аммиака у различных авторов публикаций сильно различаются [7]. В случае полной нейтрализации соли железа (III) направление процесса кристаллизации получаемого гидроксида железа зависит главным образом от pH и температуры. Изменение условий (температуры и pH раствора) позволяет существенно изменять как фазовый состав, так и размер образующихся наночастиц. Повышение температуры окисления до значений 60 – 70 °C приводит к образованию фазово-чистых частиц Fe_3O_4 кубической фазы. При увеличении температуры выше 100 °C и при pH, равном 6 – 8, образуются кристаллы оксида железа, имеющие ромбическую форму. Увеличение значения pH создает условия для роста кристаллов и возникновения частиц α -оксида железа шарообразной формы с широким распределением по размерам наночастиц. Наиболее оптимальное распределение получается при pH 2 – 4, но такие среды не приемлемы с биологической точки зрения [9]. Дисперсность осадка определяется двумя процессами: образованием зародышей и ростом частиц. Образование зародышей может быть спонтанным, когда в пересыщенном растворе под действием химических сил образуется скопление ионов, число которых достаточ-

но для кристаллизации, или индуцированным, когда ионы скапливаются вокруг посторонней твердой частицы, например, пылинки. Если размер образовавшихся частиц меньше 100 нм, то осадок не выпадает, в этом случае образуется коллоидный раствор. Стабилизация размера частиц магнетита достигается добавлением специального поверхностно-активного вещества (ПАВ) при интенсивном перемешивании раствора. Как правило, в качестве ПАВ используют вещества, состоящие из полярных органических молекул, которые и создают на поверхности дисперсных частиц адсорбционно-сольватные слои. В качестве таких веществ используют реактивы с длинной СН цепочкой, например, декстран (C_6H_{14}) [4] или маннитол ($C_6H_{14}O_4$) [10]. Любой стабилизатор приводит к снижению магнитных свойств. Поэтому насущной задачей является поиск способов снижения его концентрации. В данной работе в качестве ПАВ, останавливающего рост зародышей, использовали лимонную кислоту (2-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая кислота), которая не обладает сильными поверхностно-активными свойствами, так как мала СН цепочка, но приемлема с биологической точки зрения. В качестве стабилизатора структуры коллоидного раствора применяли цитрат натрия, который предпочтительней стандартного декстрана и позволит применять коллоидный раствор для контрастирования сосудов с малым диаметром [6]. Конечное значение pH контрастной жидкости равно 7.

Условием суперпарамагнетизма является соизмеримость размера наночастиц с размером магнитного домена, поэтому размер наночастиц является параметром, определяющим конечные магнитные и, соответственно, контрастные свойства полученных растворов. Размер и дисперсный состав наночастиц определяли с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе высокого разрешения JEOL JEM-1011, являющегося наиболее оптимальным для исследования наночастиц такого размера (5 – 20 нм). Обработку полученных результатов приводили с помощью программы Scan Soft 2000.

Возможную токсичность наночастиц оксида железа определяли с помощью культуры клеток HeLa (эпителиоидный рак шейки матки человека), предоставленной Институтом вирусологии им. И. И. Мечникова, при времени инкубации 24 ч с помощью МТТ-теста. Жизнеспособность клеток определяли по сравнению с контрольной пробой без добавления наночастиц. Использовали наночастицы, полученные в различных условиях синтеза и разными физическими параметрами.

Концентрация контрастного железа в исходном растворе определяли с помощью рентгенофлуоресцентного количественного анализа на спектрометре S4 EXPLORER (“Брукер”). Определение времен спин-спиновой релаксации (T_2) протонов проводили на ЯМР-релаксометре PC-120 фирмы “Брукер”.

Возможности полученных наночастиц оксида железа влиять на относительный контраст тканей опреде-

ляли с помощью МРТ (“Брукер”, 7,0 Т) после внутривенного введения крысе с массой тела 200 г препарата в объеме 0,1 мл.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью метода Стьюдента-Госсета с значимым отличием при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения исследований был получен коллоидный раствор на основе наночастиц сложного оксида железа, являющийся субстанцией создаваемого контрастного средства с предварительным названием феротраст. В качестве стабилизаторов использовали лимонную кислоту и цитрат натрия. Согласно технологии получения наночастиц, их дисперсность характеризуется наличием двух процессов: образованием зародышей наночастиц и ростом размера ранее образовавшихся частиц, причем скорость обоих процессов является функцией пересыщения раствора. Этим объясняется тот факт, что в коллоидном растворе наблюдается одновременное существование двух фракций наночастиц по размеру. С целью получения оптимальных контрастных свойств крупную фракцию отделяли с помощью центрифугирования тремя сериями со скоростью 800 оборотов в минуту по 5 мин и фильтрацией, что приводило к снижению концентрации оксида железа в растворе. Конечная концентрация железа в растворе феротраста, определенная с помощью рентгенофлуоресцентного количественного анализа, составила 50 г/л. Анализ микрофотографий, полученных с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 1), показал, что после дополнительной обработки феротраст содержит наночастицы с узким распределением по размерам и средним диаметром около 8,2 нм.

Известно, что наличие стабилизатора цитрата натрия ухудшает общие магнитные свойства раствора, но исследования показали, что дальнейшее снижение количества стабилизатора приводит к существенному увеличению доли крупной фракции наночастиц.

Для нахождения оптимальной концентрации ПАВ была получена зависимость жизнеспособности культуры клеток от концентрации цитрата натрия в составе феротраста при времени инкубации 24 ч (табл. 1). В результате увеличения концентраций ПАВ была снижена цитотоксичность предлагаемого контрастного средства при незначительном ухудшении магнитных свойств. По результатам исследований для создаваемого контрастного средства была выбрана оптимальная концентрация ПАВ, которая составила 59 г/л.

Полученный раствор феротраста сравнили с существующим зарубежным железосодержащим контрастным средством резовистом (“Шеринг АГ”) при их инкубации с культурами клеток с помощью МТТ-теста при концентрации железа (0,5 г/л) и времени инкубации 24 ч. Резовист представляет стабильный водный раствор покрытых карбоксидекстраном наночастиц

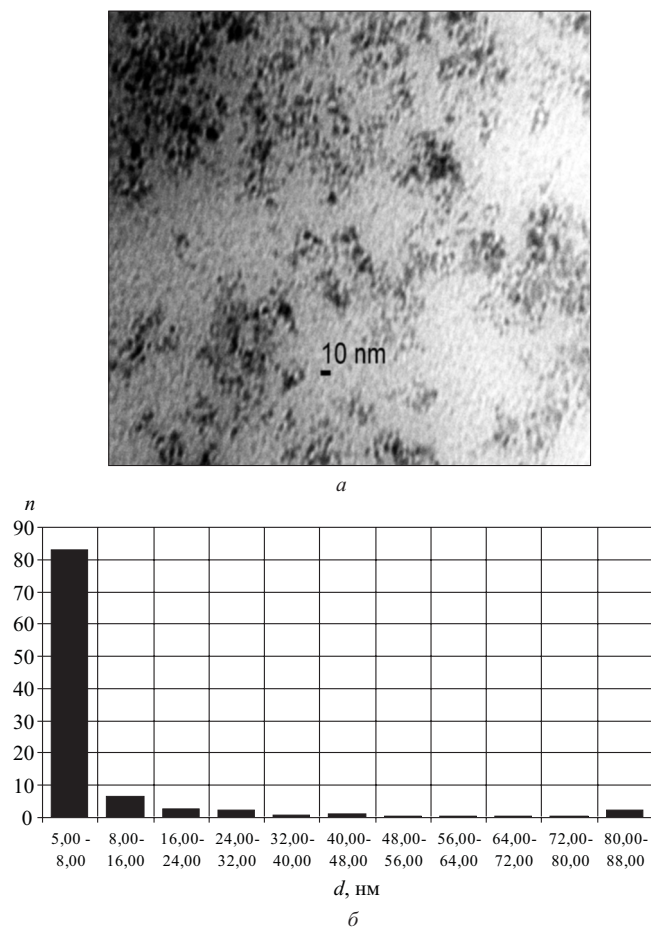


Рис. 1. Микрофотография коллоидного раствора с дополнительной обработкой, содержащего наночастицы оксида железа диаметром 8,2 нм (*а*); гистограмма распределения наночастиц по размеру (*б*).

оксида железа, который предназначен для T_2 -взвешенной визуализации ретикулоэндотелиальной системы. Жизнеспособность клеток в присутствии резовиста составила $85,9 \pm 10\%$, что практически не отличается от аналогичной величины для феротраста (табл. 1).

Для изучения парамагнитных свойств феротраста мы применили метод протонной релаксации.

Механизм ядерной магнитной релаксации характеризуется двумя не зависящими друг от друга процессами: обменом энергией внутри спиновой системы

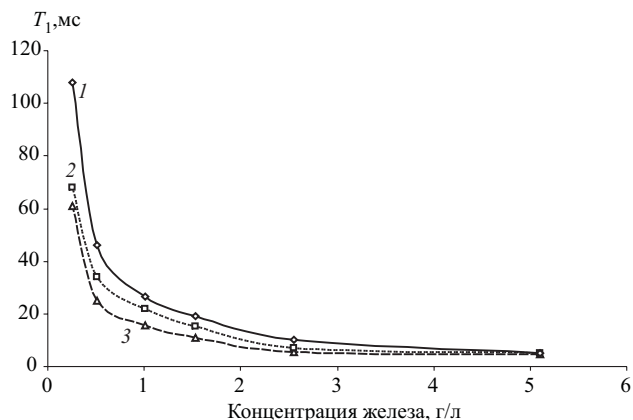


Рис. 2. Время релаксации T_1 в зависимости от концентрации коллоидного раствора наночастиц оксида железа в жидких средах: 1 — в растворе альбумина, 2 — в дистиллированной воде, 3 — в физиологическом растворе.

Таблица 2. Влияние феротраста и резовиста на времена релаксации протонов воды (рН 7,3, $T 23^\circ\text{C}$)

Концентрация железа, г/л	$T_1, \text{с} \cdot 10^{-3}$		$T_2, \text{с} \cdot 10^{-3}$	
	Феротраст	Резовист	Феротраст	Резовист
5	$5,0 \pm 0,2^*$	$8,7 \pm 0,3$	$0,55 \pm 0,1^*$	$0,31 \pm 0,1$
0,5	$34 \pm 3,0^*$	$43,0 \pm 3,0$	$6,2 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,4$
0,25	$54,0 \pm 4,0^*$	$68,0 \pm 6,0$	$12,8 \pm 0,5^*$	$10,1 \pm 0,4$

* — статистически значимые отличия феротраста от резовиста при $p \leq 0,05$.

(спин-спиновая релаксация) и обменом энергией между спиновой системой и решеткой (спин-решеточная релаксация). Каждый из этих процессов протекает во времени с некоторой определенной скоростью и характеризуется своей постоянной — временем спин-спиновой релаксации T_2 и временем спин-решеточной релаксации T_1 . Обратные величины этих времен являются мерой скорости релаксации, причем всегда $T_2^{-1} \geq T_1^{-1}$.

Таблица 1. Зависимость жизнеспособности культуры клеток HeLa от концентрации цитрата натрия в коллоидном растворе наночастиц оксида железа при времени инкубации 24 ч (% от контроля)

Концентрация цитрата натрия в исходном растворе, г/л	Концентрация контрастного средства в среде инкубации, г/л		
	0,5	0,1	0,05
0	$52,01\% \pm 16,14\%$	$86,50\% \pm 19,53\%$	$87,20\% \pm 11,28\%$
11	$58,51\% \pm 20,86\%$	$68,55\% \pm 25,51\%$	$94,41\% \pm 14,89\%$
44	$66,57\% \pm 29,99\%$	$102,89\% \pm 12,98\%$	$83,11\% \pm 22,22\%$
59	$85,08\% \pm 13,87\%$	$98,94\% \pm 16,64\%$	$98,23\% \pm 19,72\%$
82	$90,17\% \pm 15,79\%$	$110,95\% \pm 8,46\%$	$97,24\% \pm 4,36\%$

Примечание. Контроль равен 100 % жизнеспособности; * — значимые отличия от контроля при $p \leq 0,05$.

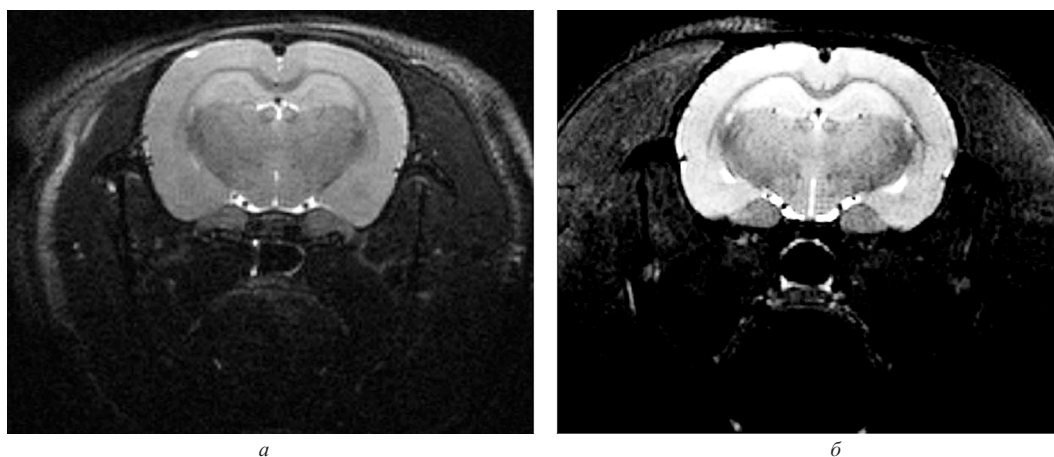


Рис. 3. МР-изображение головного мозга крысы, полученное с помощью метода магнитно-резонансной томографии: T_2 -взвешенные изображения до (а) и после (б) введения феротраста. Наблюдается увеличение относительной контрастности подкорковых структур после введения препарата в объеме 0,1 мл

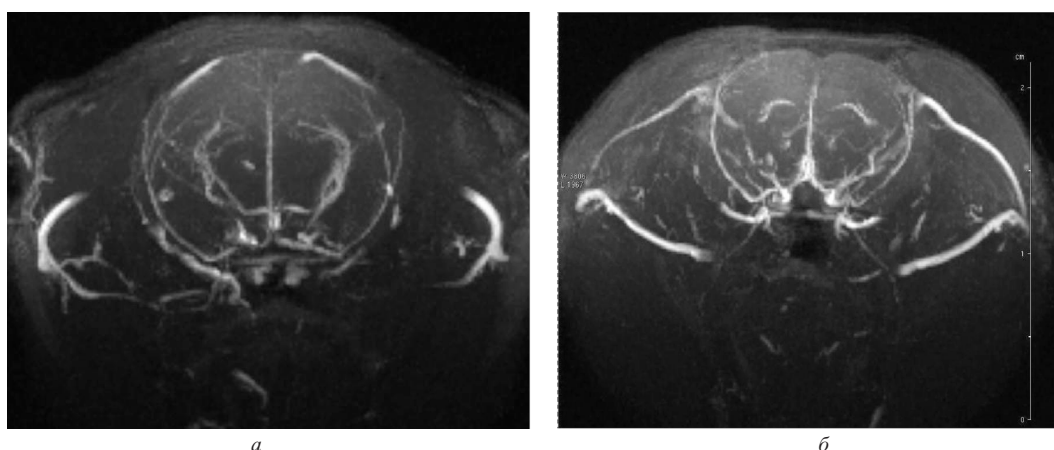


Рис. 4. Контрастное изображение сосудов головного мозга крысы, полученное с помощью метода магнитно-резонансной томографии: T_1 -взвешенное градиентное эхо до (а) и после (б) введения феротраста. Наблюдается визуализация более мелких сосудов после введения препарата.

Парамагнитные (контрастные) свойства созданного нами раствора наночастиц оксида железа (феротраст) мы сравнили с железосодержащим контрастным средством резовистом. Сравнительный анализ изменения времен релаксаций (табл. 2) веществ показал, что феротраст соизмерим по контрастным свойствам с существующим аналогом при визуализации с помощью T_2 и превосходит при T_1 исследованиях. Время релаксации дистиллированной воды до введения контрастного вещества оказалось равным $T_1 = (2,7 \pm 0,1)$ сек и $T_2 = (2,2 \pm 0,1)$ сек.

Оба вещества уменьшали время релаксации T_1 и T_2 , но в случае T_1 эффект феротраста был статистически значимо выше, что очень важно, так как T_1 -взвешенные изображения имеют большую диагностическую значимость.

В ходе проведенных исследований были получены кривые спада времени релаксации T_1 при добавление коллоидного раствора, содержащего наночастицы ок-

сида железа размером 8,2 нм, в среды альбумина, дистиллированной воды и физиологического раствора в зависимости от концентрации наночастиц оксида железа (рис. 2). Анализ кривых не показал существенных отличий кривых спада времени T_1 , что свидетельствует о возможности равномерного распределения наночастиц по исследуемой среде и отсутствию дополнительной агрегации. Влияние феротраста на раствор альбумина показало отсутствие заметного связывания наночастиц сложного оксида железа с молекулами белка.

Для оценки магнитно-резонансных контрастных свойств феротраста были проведены эксперименты на животных.

После внутривенного введения крысе 0,1 мл феротраста были получены T_1 - и T_2 -взвешенные изображения головного мозга и его сосудов (рис. 3, 4).

Таким образом, полученный устойчивый раствор феротраста со среднем диаметром наночастиц 8,2 нм

может быть использован для визуализации сосудов и внутренних органов как контрастное средство при проведении МРТ.

ВЫВОДЫ

1. Предложен метод синтеза нового контрастного средства феротраста на основе стабильного раствора биологически совместимых наночастиц сложного оксида железа с суперпарамагнитными свойствами. По степени влияния на T_1 -релаксацию показано преимущество нового средства по сравнению с существующим аналогом резовистом.

2. Феротраст имеет сходную с резовистом низкую цитотоксичность и может быть использован для визуализации кровеносных сосудов и внутренних органов.

Работа выполнена в соответствии с грантом президента РФ по поддержке ведущих научных школ НШ-2933.2006.7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Д. Мишин, *Магнитные материалы*, Высш. Школа, Москва (1981), с. 355.
2. A. E. Neuwelt, B. E. Hamilton, et al, *Kidney International*, **75**, 465 – 474 (2009).
3. I. S. Jacobs and C. P. Bean, *In Magnetism*, Academic Press, New York (1963), 3, p. 271.
4. Kin Man Ho and Pei Li, *American Chemical Society*, **24**(5), 1801 – 1807 (2008).
5. D. Kumar, J. Narayan, A. V. Sharma, and J. Sankar, *J. Magn. Magn. Mater.*, **232**, 161 (2001).
6. X. Li, X. Du, T. Huo, et al., *Acta Radiol*, **50**(6), 583 – 594 (2009).
7. I. Martinez-Mera, M. E. Espinoza-Pesqueira., R. Perez-Hernandez, and J. Arenas-Alatorre, *Materials Letters*, **61**, 4447 – 4451 (2007).
8. F. C. Meldrum, N. A. Kotov, and J. H. Feodler, *American Chemical Society*, **98**, 4506 – 4510 (1994).
9. S. C. Pang, S. F. Chin, and M. A. Anderson, *J. Colloid and Interface Sci.*, **311**, 94 – 101 (2007).
10. M. Taupitz, S. Wagner, J. Schnorr, et al., *Investigative Radiology*, **39**, 394 – 405 (2004).

Поступила 12.02.10

PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF COMPLEX IRON OXIDE NANOPARTICLES ENTERING IN MAGNETIC RESONANCE TOMOGRAPHY CONTRAST AGENT

A. G. Akopdzhanov¹, A. I. Sergeev², E. V. Manvelov¹, A. V. Semeikin¹, V. Yu. Naumenko¹, V. O. Panov¹, I. V. Bykov¹, and N. L. Shimanovskii^{1*}

¹ Department of Medical Biology, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117437, Russia

² Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina, Moscow, 119991, Russia

* e-mail: shiman@rsmu.ru

A colloidal solution of iron oxide nanoparticles has been obtained that ensures an increase in the accuracy of diagnostic information from magnetic resonance tomography (MRT) due to the acceleration of proton relaxation in tissues, which improves the contrast of T_1 - and T_2 -weighed images. Improved visualization of small vessels in rat brain has been observed after intravenous injection of 0.1 ml solution containing 5.0 mg of contrasting iron nanoparticles. The paramagnetic properties of iron oxide nanoparticles were studied by the method of proton relaxation, and their size was determined by the method of transmission electron microscopy. The toxic properties of nanoparticles were determined by their effect on cultured HeLa cells (MTT test). It is recommended to use a colloidal solution of superparamagnetic nanoparticles (size, 8.2 nm) for obtaining a pharmaceutical form of the new magnetic-resonance contrast medium Ferotrast.

Key words: Iron oxide nanoparticles, cytotoxicity, magnetic resonance tomography