

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ НАУК О МАТЕРИАЛАХ

На правах рукописи



Ефремова Мария Владимировна

**Синтез, физико-химические свойства и биомедицинское
применение гибридных материалов на основе наночастиц
магнетит-золото**

03.01.06 – БИОТЕХНОЛОГИЯ (В ТОМ ЧИСЛЕ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ)
03.01.04 – БИОХИМИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:
д.х.н., проф. Клячко Н.Л.
д.х.н., проф. Мажуга А.Г.

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Синтез и свойства частиц на основе магнетита и золота	7
1.1.1 Кристаллическая структура и магнетизм наночастиц	7
1.1.2 Синтез наночастиц магнетита	9
1.1.3 Синтез наночастиц магнетит-золото	11
1.1.3.1 Синтез наночастиц со структурой «ядро-оболочка»	12
1.1.3.2 Синтез наночастиц со структурой «гантель»	13
1.2 Применение магнитных наночастиц в биомедицине.....	16
1.2.1 Магнитно-резонансная томография	16
1.2.2 Гипертермия магнитных частиц	18
1.2.3 Доставка терапевтических агентов	20
1.2.4 Тераностика и мультимодальная визуализация	22
1.2.5 Магнито-механическое управление активностью клеток и биомакромолекул ..	24
1.3 Оптимизация свойств наночастиц для биомедицинского применения	27
1.3.1 Ключевые параметры наночастиц для усиления контраста в МРТ.....	27
1.3.2 Основные параметры наночастиц для выделения тепла в ГМЧ.....	30
1.3.3 Функционализация и свойства поверхности наночастиц.....	33
1.3.3.1 Оптимизация свойств для <i>in vivo</i> применения.....	33
1.3.3.2 Модификация поверхности наночастиц путем покрытия оболочкой.....	34
1.3.4 Токсичность материалов на основе магнитных наночастиц.....	36
1.4 Наночастицы магнетит-золото для биомедицинского применения	38
1.4.1 Применение наночастиц магнетит-золото в диагностике	39
1.4.2 Применение наночастиц магнетит-золото в гипертермии и доставке лекарств .	40
1.4.3 Применение наночастиц магнетит-золото в магнито-механической манипуляции	42
1.4.4 Применение наночастиц магнетит-золото в тераностике	43
1.4.5 Проблемы и перспективы применения наночастиц магнетит-золото в биомедицине	44
1.4.5.1 Оптимизация физических свойств наночастиц	44
1.4.5.2 Оптимизация физико-химических и биологических свойств наночастиц ...	46
1.4.5.3 Перспективное применение наночастиц магнетит-золото	48
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	50
2.1 Материалы.....	50

2.2 Методы исследования	50
2.2.1 Синтез и функционализация наночастиц	50
2.2.2 Характеризация физических и химических свойств наночастиц	55
2.2.3 Биологическое тестирование наночастиц	58
Глава 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	65
3.1 Синтез наночастиц магнетит-золото с различным размером магнитной составляющей	65
3.1.1 Синтез наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ со структурой «ядро-оболочка»	65
3.1.2 Доказательство структуры «ядро-оболочка»	67
3.1.3 Синтез наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ со структурой «гантель»	70
3.2 Исследование и оптимизация физических свойств наночастиц магнетит-золото	73
3.2.1 Структура и фазовый состав наночастиц	73
3.2.2 Магнитные свойства наночастиц	78
3.3 Оптимизация химических свойств наночастиц магнетит-золото для биомедицинских применений	83
3.3.1 Функционализация поверхности наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	83
3.3.2 Функционализация поверхности наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$	85
3.3.3 Функционализация поверхности наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ лигандами с различной природой химической связи	86
3.3.4 Исследование токсичности наночастиц	88
3.3.5 Исследование стабильности наночастиц	89
3.4 Функциональные свойства наночастиц магнетит-золото в магнитно-резонансной томографии и магнитной гипертермии	91
3.4.1 Определение характеристик наночастиц в магнитно-резонансной томографии	91
3.4.2 Определение характеристик наночастиц в магнитной гипертермии	94
3.4.3 Магнитно-резонансная томография и магнитная гипертермия <i>in vitro</i>	97
3.5 Магнито-механическое управление активностью ферментов при помощи наночастиц магнетит-золото	103
3.5.1 Модификация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ферментом	103
3.5.2 Исследование влияния магнитного поля на активность иммобилизованного фермента	105
3.6 Наночастицы магнетит-золото как платформа для тераностики и мультимодальной визуализации	111
3.6.1 Изучение токсичности и интернализации наночастиц <i>in vitro</i>	111
3.6.2 Использование наночастиц для доставки препарата в клетки опухоли <i>in vitro</i>	114

3.6.3 Изучение стабильности наночастиц в кровотоке, их накопления в опухоли и биораспределения.....	116
3.6.4 Доставка загруженного на наночастицы препарата в опухоль и его высвобождение	119
3.6.5 Наночастицы магнетит-золото как контрастные агенты для МРТ-диагностики <i>in vivo</i>	121
ВЫВОДЫ	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125
БЛАГОДАРНОСТИ	144

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени потенциальное применение биосовместимых наночастиц (НЧ) магнетита Fe_3O_4 , обладающих при этом выраженными магнитными свойствами, в биомедицине – терапии, диагностике и их комбинации (тераностике) – широко представлено в литературе. В частности, для них описана возможность адресной доставки лекарственных препаратов, управляемая внешним магнитным полем (МП) [1]; использование в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) [2]; магнитная гипертермия – контролируемый нагрев опухолевой ткани, содержащей НЧ, при помощи высокочастотного МП [3], а также целый ряд других примеров [4,5]. Создание гибридных структур на основе НЧ магнетита и НЧ благородных металлов (в том числе, золота [6]) типа «ядро-оболочка» ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$) и/ или «гантель» ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$) [7] потенциально обеспечивает дополнительные преимущества, такие как возможность одновременного введения двух типов лигандов на поверхность НЧ (комбинируя, например, лекарственные и векторные молекулы [8]), сочетание магнитной гипертермии с фототермальной терапией [9], мультимодальной визуализации [10] и т.д.

Безусловно, для получения наилучших характеристик гибридных НЧ магнетит-золото в тераностике большое значение имеет предварительная работа по оптимизации как физических, так и химических свойств самих НЧ с целью конкретного применения. При этом подавляющее большинство исследователей идут только по одному из этих путей – в частности, модифицируют поверхность НЧ (вводя стабилизирующие полимеры, ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты и т.д. [11]), либо добиваются контролируемого изменения структурных и магнитных параметров НЧ (варьируя, например, размер и форму последних [12]). В то же время, логично использовать эти этапы как дополнение друг к другу, оптимизируя вначале физические свойства гибридных НЧ магнетит-золото, которые определяют их потенциал в МРТ и магнитной гипертермии, а затем подбирая наиболее подходящий способ функционализации частиц с целью создания платформы для тераностики в том числе, адресно доставляемой. При этом наиболее привлекательным является сочетание различных ковалентно и нековалентно связанных лигандов на поверхности НЧ, в частности, за счет возможности образования прочной связи золота с широким спектром серосодержащих лигандов (энергия связи $\text{Au-S} = 40$ ккал/моль), что нехарактерно для магнетита. Кроме того, НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ являются оптимальной платформой для магнито-механического регулирования активности иммобилизованных ферментов. Отсутствие подобных комплексных исследований для описываемых гибридных НЧ в литературе обусловило актуальность данного исследования.

Цель работы: синтез, а также оптимизация физических и химических свойств гибридных НЧ магнетит-золото со структурой типа «ядро-оболочка» и «гантель» для биомедицинского применения в качестве платформы для тераностики и магнито-механического управления активностью иммобилизованных ферментов.

Задачи работы:

1. Синтезировать гибридные НЧ магнетит-золото со структурой типа $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, варьируя размер и форму их магнитной составляющей;
2. Исследовать кристаллическую структуру и магнитные характеристики НЧ, а также их контрастные свойства в МРТ и тепловыделительные свойства в ГМЧ;
3. Модифицировать поверхность НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ стабилизирующими тиол-содержащими лигандами для иммобилизации фермента с возможностью дистанционного управления его каталитической активностью;
4. Функционализировать НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, варьируя характер взаимодействия лигандов с их поверхностью; в частности, одновременно ввести ковалентно связанную флуоресцентную метку и нековалентно ввести краситель/ лекарство в полимерную оболочку на НЧ с возможностью последующего высвобождения введенного вещества;
5. Провести комплексное исследование функциональных свойств наиболее перспективных НЧ *in vitro* и *in vivo* с целью создания платформы для тераностики.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Синтез и свойства частиц на основе магнетита и золота

1.1.1 Кристаллическая структура и магнетизм наночастиц

Магнетит Fe_3O_4 представляет собой смешанный оксид железа (II, III). Он обладает кубической симметрией (параметр решетки $a = 0,8397$ нм) с кристаллической структурой обращенной шпинели и пространственной группой $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ (JCPDS №00-19-0629). В кубической решетке атомов кислорода ионы Fe^{2+} занимают половину октаэдрических позиций, в то время как ионы Fe^{3+} заполняют вторую половину октаэдрических позиций и все тетраэдрические. Fe_3O_4 проявляет ферримагнитные свойства с намагниченностью насыщения M_s при комнатной температуре, равной $92 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$, при 5 К – $96 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ [1,2]. Ниже так называемой температуры Вервея $T_v = 123$ К в магнетите происходит переход от кубической к триклинной структуре, что приводит к изменению направления оси легкого намагничивания с $\langle 111 \rangle$ на $\langle 001 \rangle$ выше и ниже T_v , соответственно, выражаясь в виде перегиба на кривой температурной зависимости намагниченности при охлаждении в нулевом поле (ZFC-кривой) [15].

Маггемит $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ является окисленной до оксида железа (III) формой магнетита, которая обладает катион-дефицитной структурой обратной шпинели с кубической симметрией ($a = 0,8346$ нм) и пространственной группой $\text{P}\bar{4}_3\text{2}$ (JCPDS № 00-39-1346). $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ также является ферримагнетиком, M_s которого при комнатной температуре ниже, чем у Fe_3O_4 и составляет $74 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ [13]. Ниже критического размера D_c (для Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ данная величина, по разным источникам, находится в интервале от 35 до 100 нм [16,17]) НЧ находятся становятся однодоменными с максимально достижимой коэрцитивной силой H_c , а при уменьшении диаметра до 15-20 нм [18] переходят в суперпарамагнитное состояние с $H_c = 0$. Его характеристикой на ZFC-кривой является температура блокировки T_B , соответствующая температуре, при которой магнитные моменты НЧ не успевают подвергаться флуктуациям за счет термической активации за время измерения. С ростом размера НЧ T_B повышается [19].

Актуальным вопросом является способ определения степени окисления железа для НЧ, представляющих собой нестехиометричный Fe_3O_4 . В частности, рентгеновские спектры Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ практически не отличаются друг от друга за исключением незначительного сдвига пиков $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в сторону больших углов за счет изменения межплоскостных расстояний [13]. Величина M_s также позволяет лишь косвенно судить о

составе НЧ, так как в большинстве случаев полученные значения соответствуют промежуточным между Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ или значительно ниже объемных величин вследствие возрастания доли поверхностных атомов, находящихся в иных условиях (координационное число, симметрия локального окружения), чем атомы в объеме. Однако известно, что с ростом диаметра НЧ их M_s увеличивается, а при размере 100-150 нм может достигать значений объемного материала [19].

Тем не менее, определить стехиометрию Fe/ O в НЧ позволяет метод Мёссбауэровской спектроскопии. Спектр магнетита представляет собой суперпозицию двух секстетов: одного от ионов Fe^{3+} тетраэдрических позиций (А) и второго от ионов Fe^{3+} и Fe^{2+} , связанных электронным обменом и локализованных в октаэдрических позициях (В). Соотношение площадей в спектре от тетра- и октаэдрических ионов железа (S_A и S_B , соответственно) составляет 0,53. Это несколько отличается от теоретического значения 0,5 за счет большего объема октаэдров по сравнению с тетраэдрами, большей амплитуды колебаний в них ионов железа и, соответственно, меньшей вероятности резонансного эффекта (при этом $f_B = 0,94f_A$ [20]).

В нестехиометрическом магнетите по мере приближения членов магнетит-маггемитового ряда к маггемиту увеличивается число вакансий φ для Fe^{2+} , при этом кристаллохимическую формулу можно записать как: $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}_{1-3x} \text{Fe}^{3+}_{1+2x} \varphi_x]\text{O}_4$. Особенностью Мёссбауэровских спектров нестехиометрического магнетита является то обстоятельство, что при наличии вакансий нарушается электронный обмен между Fe^{3+} и Fe^{2+} в октаэдрической подрешетке, и доля Fe^{3+} не участвующая в электронном обмене за счет дефицита ионов Fe^{2+} , вносит вклад в тетраэдрический пик Мёссбауэровского спектра. Если считать вероятности резонансного эффекта для железа А и В позиций равными, тогда отношение S_A/S_B будет равно $(1+5x)/(2-6x)$, а с учетом того, что $f_B = 0,94f_A$, соотношение S_A/S_B будет иметь вид (1) [20,21]:

$$\frac{S_A}{S_B} = \frac{1+4,7x}{0,94(2-6x)}; \quad (1)$$

и формульный коэффициент вакансий x будет определяться по формуле (2):

$$x = \frac{1,88 \frac{S_A}{S_B} - 1}{4,7 + 5,64 \frac{S_A}{S_B}}; \quad (2)$$

Золото Au обладает кубической гранецентрированной решеткой (пространственная группа Fm-3m, JCPDS №03-065-8601) с параметром решетки $a = 0,4078$ нм. Золото является диамагнетиком. НЧ Au обладают явлением поверхностного плазмонного резонанса (ППР), заключающимся в коллективных колебаниях электронов проводимости при воздействии внешнего электромагнитного излучения определенной частоты.

1.1.2 Синтез наночастиц магнетита

Синтез НЧ магнетита и маггемита с контролируемым размером, формой и химией поверхности представляет собой фундаментальную научную проблему, а также является важным с точки зрения дальнейшего применения в биотехнологии [4]. Ниже систематизированы основные методы, разработанные в течение последних десятилетий.

Метод соосаждения является наиболее простым подходом к синтезу водорастворимых НЧ средним диаметром от 5 до 100 нм с высоким выходом [22]. Процедура заключается в приготовлении стехиометрической смеси солей железа (II) и (III) в водном растворе с последующим добавлением основания, например NH_4OH или NaOH , что приводит к образованию НЧ магнетита в ходе реакции: $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$. После того, как данный метод был описан впервые [23], исследователями было изучено влияние таких параметров синтеза, как природа и концентрация солей, pH и ионная сила среды, температура, присутствие кислорода и т.д. на размер, состав и морфологию получаемых НЧ [24]. Кроме того, для их стабилизации возможно дополнительное введение в реакцию поверхностно-активных веществ (ПАВ). Несмотря на доступность и высокую воспроизводимость метода, его использование, как правило, приводит к синтезу НЧ с широким распределением по размеру и форме [25].

Высокотемпературное термическое разложение представляет собой альтернативный способ получения монодисперсных НЧ размером от 5 до 50 нм с высокой степенью кристалличности, позволяющий эффективно контролировать их размер и форму [26]. Данный подход основан на использовании металлоорганических прекурсоров (олеата, ацетилацетоната, N-нитрозофенилгидроксиламина, пентакарбонила) железа, которые подвергаются разложению в органических растворителях (дифениловый, дибензиловый, октиловый эфиры, 1-октадецен, триоктиламин) при температуре их кипения (260 – 350 °C) в присутствии ПАВ (олеиновая кислота, олеиламин, гексадециламин и т.д.) [27]. Разложение прекурсоров с катионными центрами при наличии восстановителя приводит непосредственно к НЧ Fe_xO_y , тогда как при использовании металлоорганических прекурсоров с нулевой степенью окисления Fe, вначале получают НЧ железа, которые переходят в магнетит/ маггемит при последующем окислении, например, кислородом воздуха [28]. Размер и форма получаемых НЧ (сферы, кубы, октаэдры, призмы, тетраподы и т.д.) определяются тремя основными факторами: температура кипения смеси (повышение приводит к увеличению размеров НЧ), соотношение прекурсор/ ПАВ (избирательная сорбция последнего на определенных гранях растущих кристаллов приводит к получению НЧ несферической

формы) и продолжительность реакции после достижения точки кипения (увеличение которой приводит к росту размера НЧ) [26,29]. К недостаткам метода термического разложения относится проведение реакции при повышенных температурах, а также гидрофобность получаемых НЧ, требующая для биомедицинского применения дальнейшего перевода в водную фазу.

Гидротермальный синтез в специальных реакторах/ автоклавах используется для получения НЧ в водных средах при высоких температурах (выше 200 °С) и давлениях (до 4 МПа). Основными химическими процессами в описываемом методе являются гидролиз и окисление солей металлов, при этом высокая скорость зародышеобразования приводит к получению НЧ относительно малых размеров [30,31]. Контроль их распределения по размеру и формы в данном подходе осуществляется за счет подбора температуры реакции, концентрации реагентов и их стехиометрического состава, добавления затравок; также возможно использование неводных растворителей (в этом случае метод называют сольвотермальным) и микроволнового излучения [32]. Существенным преимуществом представленного подхода является высокая степень кристалличности получаемых НЧ, что в случае магнитных наноматериалов практически всегда означает повышение их намагниченности насыщения и важно с практической точки зрения [33]. Тем не менее, поскольку реакция проходит в «автоматическом» режиме, понимание гидротермальных процессов затруднено, что ограничивает развитие универсальной теоретической основы данного метода.

Метод микроэмульсий основан на использовании изотропных и термодинамически стабильных систем, состоящих из двух несмешивающихся фаз: полярной (обычно – вода) и неполярной (различных олефинов и углеводородов) в присутствии ПАВ, таких бромид цетилтриметиламмония, бис (2-этилгексил) сульфосукцинат, поливинилпирролидон и т.д. [34]. Последние образуют монослой на границе раздела фаз, причем гидрофобные хвосты ПАВ находятся в неполярной области, а гидрофильные головки – в полярной, образуя при этом мицеллы, размер которых определяется соотношением вода/ ПАВ. Существует два основных типа микроэмульсий: «масло в воде» (o/ w) либо «вода в масле» (w/ o), при этом в одной из фаз растворены соли металлов, а в другой – основания. Образующиеся мицеллы выступают как нанореакторы, в которых создается среда для зарождения и роста НЧ [35]. Диаметр последних легко контролировать путем регулирования размера мицелл, начальной концентрации реагентов и природы ПАВ. Метод микроэмульсий позволяет получать узкое распределение НЧ по размеру в диапазоне 1-50 нм, однако существенными недостатками данного подхода является низкий выход и затрудненность масштабирования.

К менее распространенным методам синтеза НЧ для биомедицинского применения относятся химическое осаждение из газовой фазы, электрохимический синтез, пиролиз аэрозолей, синтез с использованием ультразвука, а также биологические подходы с использованием бактерий [4].

1.1.3 Синтез наночастиц магнетит-золото

В основе подавляющего большинства подходов к синтезу гибридных НЧ $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4 - \text{Au}$ ($x = 0$ для магнетита и $x = 0,33$ для маггемита) лежит принцип последовательного роста компонентов. Иными словами, НЧ магнетита/ золота используются в качестве центров для гетерогенного зародышеобразования НЧ золота/ магнетита, соответственно [7]. Основной проблемой при этом является подавление гомогенного зародышеобразования отдельных НЧ обеих фаз. Решение достигается экспериментально путем подбора условий проведения реакции, таких как соотношение прекурсоров, температура, скорость нагрева, pH и т.д. Данные параметры обуславливают определенный химический состав каждого из получаемых компонентов гибридной структуры (в частности, соотношение магнетит/ маггемит), а также их размер и форму [36]. Это, в свою очередь, оказывает непосредственное влияние на интенсивность и длину волны ППР НЧ золота, а также полную намагниченность и среднее значение температуры блокировки НЧ магнетита [37]. Таким образом, параметры синтеза выбирают, ориентируясь на требуемые свойства конечного материала.

Ниже описаны основные подходы к получению НЧ магнетит-золото. При этом для основного рассмотрения, когда в качестве исходного компонента используются НЧ магнетита, выбрана структура «ядро-оболочка» (рисунок 1, а). В случае гетерогенного зародышеобразования НЧ магнетита на поверхности НЧ золота наиболее ярким и изученным в литературе примером является структура типа «гантель» (рисунок 1, б).

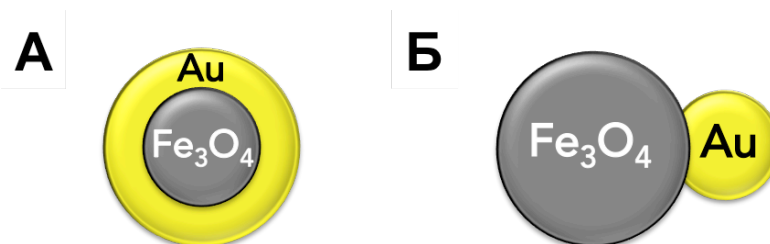


Рисунок 1 – Схематичное изображение структуры НЧ магнетит-золото типа «ядро-оболочка» (А) и «гантель» (Б)

1.1.3.1 Синтез наночастиц со структурой «ядро-оболочка»

Структура типа «ядро-оболочка» ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$) включает в себя одно или несколько ядер Fe_3O_4 , полностью покрытых сферической оболочкой Au [7]. По сравнению с исходными НЧ магнетита, НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ обладают меньшей намагниченностью в пересчете на массу материала вследствие вклада золота. С другой стороны, оболочка защищает магнитное ядро от окисления и сохраняет его исходные свойства в течение длительного времени. Кроме того, золото играет роль диамагнитного слоя, предотвращающего агрегацию НЧ Fe_3O_4 вследствие магнитных взаимодействий. Дополнительный вклад золота в стабилизацию гибридных НЧ заключается в возможности его легкой функционализации тиол-содержащими лигандами и полимерами, улучшающими при этом биосовместимость конечных материалов [38]. На основании теории Ми, оптические свойства НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ сильно отличаются от свойств НЧ Au. Поэтому, только изменяя соотношение между размером ядра Fe_3O_4 и толщиной оболочки Au, становится возможным регулировать положение ППР золота от видимой до ближней инфракрасной (ИК) области.

В большинстве случаев синтез НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ представляет собой химическое осаждение, включающее восстановление ионов Au^{3+} на поверхности ранее синтезированных НЧ Fe_3O_4 (методы получения см. в главе 1.1). При этом процесс может протекать по двум основным путям. В первом случае в качестве промежуточного этапа выступает покрытие НЧ Fe_3O_4 предварительно полученными зародышами золота (например, путем восстановления золотохлористоводородной кислоты HAuCl_4 боргидридом натрия NaBH_4 [39]), которые выступают в качестве центров зародышеобразования для последующего роста сплошного слоя Au с использованием в качестве восстановителя формальдегида, N, N-диметилформамида, NaBH_4 и т.д. [40]. Данный метод является многостадийным, однако позволяет контролировать морфологию золотой оболочки. При этом для связывания с зародышами золота НЧ Fe_3O_4 могут быть сначала покрыты диоксидом кремния. Так, в работе [41] покрытие SiO_2 наносилось методом Штобера, затем его внешний слой был функционализирован 3-аминопропилтриметоксисиланом, который способствовал осаждению зародышей Au за счет электростатического взаимодействия. На заключительном этапе при восстановлении HAuCl_4 формальдегидом была получена сплошная золотая оболочка. Стоит отметить, что покрытие магнетита 3-аминопропилтриметоксисиланом с целью последующего наращивания слоя Au может проводиться и напрямую [42].

Вторым подходом к нанесению золотой оболочки является так называемый одностадийный метод [43]. При этом атомы золота непосредственно осаждаются на НЧ Fe_3O_4 путем восстановления солей, содержащих ионы Au^{3+} . Основным принципом формирования золотой оболочки в этом случае является то, что поверхность ядра Fe_3O_4 должна быть определенным образом заряжена для притяжения молекул золотосодержащих прекурсоров. Достоинством данной группы методов является отсутствие промежуточных стадий, однако управление морфологией конечных наноструктур представляется затруднительным. При этом реакция покрытия золотом может протекать как при кипении, так и при комнатной температуре [44,45], как в водной среде, так и в органической фазе [46,47]. В качестве восстановителя ионов Au^{3+} в водном растворе распространено использование цитрата натрия, который добавляется первым для стабилизации НЧ Fe_3O_4 и вытеснения гидроксид-ионов с их поверхности [48]. Альтернативой является использование диметилформамида, NaBH_4 , гидрохлорида гидроксилamina $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ [49]. Толщину золотой оболочки можно регулировать путем подбора соотношения между НЧ Fe_3O_4 и золотосодержащим прекурсором.

Тем не менее, в литературе известны примеры получения НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ с морфологией, отличной от сферической. Так, в работе [50] НЧ Fe_3O_4 кубической формы были функционализированы поли-L-гистидином за счет электростатического взаимодействия, при этом их положительно заряженная поверхность способствовала адсорбции ионов AuCl_4^- , которые впоследствии были восстановлены NaBH_4 . Аналогичные результаты в этой же статье были получены при предварительной модификации поверхности Fe_3O_4 имидазольными группами. Толщина золотой оболочки в обоих случаях составила всего несколько нм, при этом сохранялась исходная кубическая форма ядра.

1.1.3.2 Синтез наночастиц со структурой «гантель»

Структура НЧ магнетит-золото типа «гантель» ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$) асимметрична и представляет собой попарно связанные на границе раздела фаз НЧ Fe_3O_4 и Au [51]. При этом рост НЧ магнетита происходит на определенной кристаллографической плоскости золота, либо же НЧ химически присоединены к нему с помощью связующего агента, а прочие участки поверхности золота блокируются лигандами с нулевой афинностью к Fe_3O_4 . Помимо физической бифункциональности (вышеописанного сочетания магнитных и плазмонных свойств), структуры $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ бифункциональны и с химической точки зрения, так как в их состав входит два различных типа поверхности (оксид и металл). Это

существенно расширяет спектр возможностей при последующей модификации, в частности, различными биологическими молекулами, для *in vitro* и *in vivo* применений.

По сравнению с НЧ типа «ядро-оболочка» структуры $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ могут обладать интересными особенностями в магнитном поведении, связанными с переносом электронов, упорядочением спинов, а также диполь-дипольным взаимодействием на границе раздела между диамагнитным Au и ферро-/ферромагнитным Fe_3O_4 [7,52]. Безусловно, это сказывается при отклике НЧ на внешнее МП, что, в свою очередь, может оказаться выгодным с точки зрения дальнейшего применения, например, в МРТ или ГМЧ по сравнению со «свободными» НЧ Fe_3O_4 .

Все методы синтеза НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ можно разделить на две большие группы – одностадийные с одновременным введением в реакцию железосодержащего и золотосодержащего прекурсоров, и двухстадийные, заключающиеся в росте магнетита на предварительно синтезированных зародышах золота, вносимых в реакцию уже в виде НЧ. При этом в подавляющем большинстве работ НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ получают в органической фазе (в отличие от вышеописанных методов синтеза НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$).

Одностадийный метод заключается в смешении всех прекурсоров в одной реакционной системе и совместном нагреве в высококипящем растворителе, приводящем к получению НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$. Как правило, соль золота (HAuCl_4 или $\text{Au}(\text{OAc})_3$) вводят в реакционную смесь в начале реакции либо уже на стадии нагрева [53–55]. Так, в работе [56], впервые описывающей получение НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ со структурой «гантель», раствор HAuCl_4 в 1-октадеcene вводили спустя 3 минуты после впрыскивания пентакарбонила железа $\text{Fe}(\text{CO})_5$ в предварительно нагретую до 120 °С смесь 1-октадецена, олеиновой кислоты, олеиламина и 1,2-гександекандиола (выступающего в роли восстановителя золота), после чего систему доводили до кипения (310 °С). Размер получаемых в составе гибридной структуры НЧ Au контролировался выбором температуры введения HAuCl_4 . Так, ее повышение со 120 до 180 °С приводило к увеличению диаметра НЧ Au с 3 до 6 нм.

В работе [10] НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ синтезировали путем добавления HAuCl_4 в раствор, содержащий олеиновую кислоту, олеиламин, 1,2-гександекандиол и $\text{Fe}(\text{CO})_5$. При этом вначале образовывались НЧ Au (при 140 °С), после чего температуру реакционной смеси увеличивали для разложения $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Оно приводило к росту металлических НЧ железа на поверхности НЧ Au, которые в дальнейшем окисляли до Fe_3O_4 кислородом воздуха. Размер получаемых НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ варьировали от 5 до 12 нм исключительно путем подбора соотношения между $\text{Fe}(\text{CO})_5$ и HAuCl_4 . Вместо пентакарбонила железа возможно использование его олеата или ацетилацетоната. Так, в работе [57] смесь $\text{Fe}(\text{acac})_3$, HAuCl_4 , 1,2-гександекандиола в 1-октадеcene в присутствии олеиламина и олеиновой кислоты в

качестве ПАВ, вначале нагревали до 120 °С (в течение 30 минут), а затем до 260 °С. В результате были получены НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, в состав которых входили НЧ Fe_3O_4 диаметром 15 нм и НЧ Au диаметром 7 нм.

Двухстадийный метод представляет собой рост НЧ Fe_3O_4 на поверхности отдельно полученных НЧ Au, которые вводят в реакционную смесь, содержащую прекурсор железа, уже в виде зародышей. Это сближает данный подход с получением НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$, главное отличие состоит в обратном порядке получения компонентов и асимметричном росте. Также, как и в одностадийном методе, образование НЧ Fe_3O_4 на поверхности НЧ Au происходит при термическом разложении пентакарбонила, олеата или ацетилацетоната железа [8,58,59]. Рост Fe_3O_4 зависит от многих параметров, включая природу и концентрацию его прекурсора, природу и концентрацию ПАВ, соотношение зародыши/ прекурсор, скорость нагрева, температуру и время изотермической выдержки, а также полярность растворителя [37]. Последний параметр является ключевым, поскольку в неполярном растворителе НЧ Au заряжены более отрицательно, предотвращая зарождение и/ или рост Fe_3O_4 на их поверхности при разложении прекурсора железа (в основном, $\text{Fe}(\text{CO})_5$). В результате каждая НЧ Au выступает в качестве центра зародышеобразования только одной НЧ Fe_3O_4 с образованием структуры типа «гантель». В полярном растворителе общий отрицательный заряд НЧ Au уменьшается, что делает возможным рост более одной НЧ Fe_3O_4 на их поверхности.

В работе [37] НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ синтезировали при использовании в качестве зародышей НЧ Au диаметром 10 нм. Варьируя природу железосодержащего прекурсора, а именно используя либо $\text{Fe}(\text{CO})_5$, либо $\text{Fe}(\text{acac})_3$, было обнаружено, что последний гораздо более чувствителен к изменению параметров синтеза, чем первый. Таким образом, его термическое разложение может приводить как к гетерогенному, так и к гомогенному зарождению и росту НЧ Fe_3O_4 в зависимости от температуры реакции и природы растворителя. В работе [60] НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ были получены на зародышах Au различного диаметра (2,5, 4, 7 либо 10 нм). Авторы показали, что окончательную морфологию полученных гибридных структур можно контролировать только путем изменения размера НЧ Au.

Статья [61] является единичным примером синтеза НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в водной фазе с обратным порядком получения компонентов. В качестве зародышей использовались НЧ Fe_3O_4 , покрытые поливинилпирролидоном, который в дальнейшем способствовал гетерогенному зародышеобразованию золота при восстановлении HAuCl_4 цитратом натрия. Размер НЧ Au при этом можно варьировать от 3 до 12 нм, изменяя соотношение HAuCl_4 / цитрат натрия.

1.2 Применение магнитных наночастиц в биомедицине

Как уже упоминалось ранее, НЧ на основе оксидов железа представляют особый интерес для биомедицинских применений благодаря уникальному сочетанию магнитных свойств, высокому отношению поверхность/ объем, а также биосовместимости. Ниже будут рассмотрены основные области, как ставшие уже «классическими» (магнитно-резонансная томография, гипертермия магнитных частиц, доставка терапевтических агентов), так и тенденции последнего десятилетия (тераностика, мультимодальная визуализация, магнито-механическое управление активностью клеток и биомакромолекул). В главе 1.2 будут освещены теоретические основы методов, а в главе 1.4 – примеры использования для этих целей НЧ магнетит-золото с указанием их преимуществ.

1.2.1 Магнитно-резонансная томография

Магнитно-резонансная томография (МРТ) широко используется в качестве неинвазивного метода для получения анатомической и функциональной информации, а именно пространственного и временного контрастирования мягких тканей [2]. Метод МРТ основан на физическом явлении ядерного магнитного резонанса атомов водорода. Поскольку человеческий организм состоит главным образом из воды и жира, атомы водорода составляют около 63% его массы. В постоянном МП B_0 спины ядер водорода выстраиваются параллельно или антипараллельно внешнему полю. Разница в количестве параллельных и антипараллельных протонов определяется разностью энергий между двумя состояниями ΔE . При облучении перпендикулярным B_0 резонансным радиочастотным импульсом B_1 ядра поглощают электромагнитную энергию, а количество антипараллельных спинов увеличивается. Таким образом, продольная намагниченность M_{xy} (параллельная внешнему полю) уменьшается, а поперечная намагниченность M_z (перпендикулярная внешнему полю) увеличивается.

После снятия возбуждающего импульса B_1 ядерные спины возвращаются в исходное состояние (M параллельно B_0), данный процесс называется релаксацией. Он состоит, во-первых, из продольной (T_1) релаксации, когда M_z возвращается в исходное состояние; во-вторых, из поперечной (T_2) релаксации, заключающейся в спаде M_{xy} до нуля. В этих процессах T_1 - время, необходимое для восстановления продольной намагниченности до 63% от равновесного значения, тогда как T_2 - время, необходимое спада поперечной намагниченности до 37% от ее величины. За счет различий во временах

T_1 и T_2 тех или иных тканей, из данных релаксационных процессов можно реконструировать МРТ-изображения. Тем не менее, в большинстве случаев «внутреннего» контраста недостаточно, и для его усиления используются специальные вещества, называемые контрастными агентами, которые улучшают видимость тканей путем целенаправленного изменения в них времен релаксации [3]. К так называемым T_1 -контрастным агентам относятся парамагнитные комплексы гадолиния Gd^{3+} и марганца Mn^{2+} , которые координируют вокруг себя молекулы воды. За счет этого усиливаются флуктуации МП, испытываемые соседними протонами, и уменьшается время T_1 -релаксации, что приводит к повышению сигнала на МРТ-изображении. T_2 -контрастными агентами являются ферро-, ферри- и суперпарамагнитные НЧ оксидов железа, в частности, магнетита и маггемита, которые создают локальные градиенты МП и уменьшают время T_2 -релаксации (интенсивность сигнала на изображениях снижается). Таким образом, во всех случаях скорость релаксации протонов возрастает в присутствии контрастных агентов, что связано с добавлением их вклада (релаксивности) к собственной скорости релаксации протонов. Количественно это можно выразить как (3):

$$R_i = 1/T_i + r_i \cdot C \quad (i = 1, 2), \quad (3)$$

где R_i – наблюдаемая скорость релаксации (в s^{-1}), $1/T_i$ – собственная скорость релаксации протонов (в отсутствие контрастного агента, s^{-1}), r_i – релаксивность контрастного агента ($mM^{-1} \cdot s^{-1}$), C – концентрация контрастного агента (mM). В связи с направленностью экспериментальной части работы далее будут обсуждаться именно T_2 -контрастные агенты и R_2 -релаксивность, соответственно.

Взаимодействие магнитных НЧ с протонами воды описывается так называемой моделью внешней сферы, а скорость релаксации можно записать в виде формулы (4) [62]:

$$R_2 = \frac{(\frac{64\pi}{135000})\gamma^2 N_A M \mu_c^2}{rD}, \quad (4)$$

где N_A - число Авогадро, M - молярность НЧ, μ_c - магнитный момент НЧ или их кластера, r - радиус НЧ, D - константа диффузии молекул воды. Важно отметить, что большинство НЧ в растворе находятся в форме агрегатов, гидродинамический радиус R_{HD} которых отличается от размеров НЧ по данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и включает их покрытие (например, молекулами полимера), что влияет также на диффузию молекул воды и конечную величину R_2 . Приведенное уравнение учитывает данный фактор, поэтому величина r в формуле соответствует эффективному радиусу агрегатов НЧ.

Таким образом, на величину R_2 оказывают влияние магнитные свойства НЧ, такие как магнитный момент (μ_c) или намагниченность насыщения, эффективный размер НЧ или их агрегатов (r), а также константа диффузии молекул воды вокруг магнитного ядра

НЧ, которая в основном связана с характером их органического покрытия. Вышеперечисленными параметрами так или иначе можно управлять при оптимизации свойств НЧ как контрастных агентов, что будет рассмотрено в дальнейшем. Безусловно, одной из важнейших областей применения МРТ является диагностика онкологических заболеваний. Для этого на основе магнитных НЧ был разработан ряд коммерчески доступных контрастных препаратов (Feridex, Combidex, Resovist, Gastromark, Feraheme со средними значениями R_2 от 100 до 150 $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [63]), однако к настоящему времени из клинической практики были выведены все, кроме последнего [64,65] вследствие доказанных побочных эффектов. Таким образом, разработка и дизайн новых T_2 -контрастных агентов остается крайне актуальной задачей.

1.2.2 Гипертермия магнитных частиц

В терминах медицины гипертермия является подходом к лечению онкологических заболеваний, при котором интересующая область организма подвергается воздействию температур выше нормального физиологического значения (37°C). Принцип действия гипертермии заключается в различной чувствительности здоровых и опухолевых клеток к нагреву. Вследствие быстрого роста, присущего опухолевой ткани, и возникающего при этом в ней недостатка кислорода и питательных веществ, повышение температуры до $42 - 46^\circ\text{C}$ вызывает необратимое изменение функции клеток злокачественных новообразований и их контролируемую гибель (апоптоз) [66]. В гипертермии магнитных частиц (ГМЧ) повышение температуры достигается за счет генерации тепла магнитными НЧ в переменных МП. Данный метод был впервые представлен в 1957 г в работе [67], авторы которой подвергали локальному нагреву лимфатические узлы, содержащие магнитные НЧ. С тех пор, судя по количеству публикаций, интерес к дизайну ГМЧ и улучшению тепловыделительных свойств НЧ неуклонно возрастает [68]. В настоящее время в клинической практике для ГМЧ используется только один препарат – Nanotherm, представляющий собой сферические НЧ Fe_3O_4 диаметром 15 нм, покрытые аminosиланом. Препарат успешно применяется в терапии мультиформной глиобластомы, онкологических заболеваний предстательной железы и пищевода [69], однако вводимая доза крайне высока ($112 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$).

Способность магнитных НЧ в растворе генерировать тепло под действием переменного МП характеризуется удельным коэффициентом поглощения (SAR) или, что то же самое, удельной мощностью тепловыделения (SLP), определяемой как (5):

$$\text{SLP} = C \frac{\Delta T}{\Delta t} \frac{m}{m_{\text{Fe}}}, \quad (5)$$

где C – удельная теплоемкость коллоидного раствора НЧ (принимается равной теплоемкости воды = 4,16 Дж/(г·К)), m – масса раствора, m_{Fe} – масса железа, содержащегося в растворе, а $\Delta T/\Delta t$ – скорость повышения температуры со временем на начальном участке кривой нагрева, аппроксимируемом прямой (К/с). Таким образом, SLP измеряется в Вт·г⁻¹ (железа). Чем больше SLP, тем более эффективно в пересчете на массу материала происходит выделение тепла под действием поля. Необходимо помнить, что скорость нагрева НЧ зависит от характеристик внешнего МП; в связи с этим значения SLP для разных систем необходимо сравнивать при одной и той же частоте и амплитуде МП.

За рассеяние тепла магнитными НЧ в переменном МП ответственны два механизма: гистерезисные и релаксационные потери [70]. Для многодоменных ферро- или ферритмагнитных НЧ основные потери тепла возникают вследствие создания, смещения и исчезновения доменных стенок, а также гистерезисного магнитного поведения. Для однодоменных, а также суперпарамагнитных НЧ преимущественным механизмом преобразования электромагнитной энергии в тепло является Неелевская и Брауновская релаксация, то есть, поворот магнитного момента НЧ по направлению вектора индукции внешнего МП [71]. В случае Брауновской релаксации это происходит за счет вращения НЧ как целого, а соответствующее время τ_B зависит от R_{HD} НЧ и рассчитывается как:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T}, \quad (6)$$

где η – вязкость среды, V_H – гидродинамический объем НЧ, k_B – константа Больцмана, T – температура. При релаксации по Неелю переориентация магнитного момента осуществляется в практически неподвижной НЧ, а соответствующее время τ_N зависит от магнитокристаллической анизотропии и анизотропии формы НЧ как (7):

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV}{k_B T}}, \quad (7)$$

где τ_0 – предэкспоненциальный множитель, K – эффективная константа анизотропии, V – объем магнитного ядра НЧ, $k_B T$ – тепловая энергия НЧ.

Оба процесса всегда происходят параллельно, а преимущественным является тот, чье характеристическое время меньше. Таким образом, доминирующий механизм тепловых потерь в переменном МП определяется, главным образом, размером магнитного ядра НЧ. Брауновская релаксация преобладает для НЧ большего размера в средах с меньшей вязкостью, а Неелевская – наоборот [3]. Кроме того, энергетический барьер вращения НЧ может повышаться при диполь-дипольных взаимодействиях вследствие затрудненного вращения спинов, что будет увеличивать время релаксации НЧ и, следовательно, влиять на процессы тепловыделения. Все эти параметры необходимо принимать во внимание при дизайне магнитных НЧ как источников тепла в ГМЧ.

1.2.3 Доставка терапевтических агентов

В настоящее время в терапии онкологических заболеваний существует проблема повышения эффективности доставки препаратов в опухоль. Это относится как к низкомолекулярным агентам для химиотерапии, так и к биологическим молекулам – ДНК/РНК, различным белкам – для генной терапии [72]. В данных подходах препараты вводятся внутривенно, после чего происходит их системное неспецифическое распределение по всему организму. При этом токсическому воздействию подвергаются как нормальные, так и злокачественные клетки, что приводит к множествам побочных эффектов [73]. Кроме того, для определенных агентов критичным моментом является быстрый метаболизм и выведение из организма, что дополнительно снижает их противоопухолевую активность [5]. Таким образом, терапевтическую эффективность препаратов необходимо повышать за счет увеличения их концентрации в целевой области, при успешном достижении и накоплении в которой возможно также снижение общей вводимой дозы лекарственного средства. Одним из способов решения вышеописанной проблемы является загрузка терапевтических агентов на магнитные НЧ, которые затем могут быть доставлены в опухоль пассивным или активным способом.

Пассивное накопление НЧ происходит вследствие так называемого эффекта повышенной проницаемости и удержания в опухоли (EPR-эффекта), являющегося следствием особенностей ее ангиогенеза и лимфангиогенеза [69]. При этом высокая проницаемость наблюдается за счет дефектной структуры кровеносных сосудов, имеющих отверстия размером в сотни нм (вследствие отсутствия базальной мембраны, характерной для нормальных сосудов, а также прерывистого эпителия). Повышенное удержание происходит вследствие недостаточного лимфатического дренажа, типичного для злокачественных новообразований [74]. Совокупность данных явлений приводит к тому, что циркулирующие в сосудах опухоли НЧ попадают во внутриопухолевое пространство и задерживаются в нем.

Безусловно, эффективность пассивного накопления магнитных НЧ определяется целым рядом их физико-химических характеристик, таких как размер (будет рассмотрен в данном разделе), заряд, характер покрытия (обсуждаются в главе 1.3). Все эти факторы влияют на поведение НЧ в кровотоке, взаимодействие с белками плазмы, захват и выведение макрофагами, которые в совокупности определяют биораспределение НЧ в организме и эффективность доставки загруженных на них препаратов в опухоль. Размер НЧ при этом является одним из наиболее важных параметров, влияющих на судьбу НЧ *in vivo* и интернализацию клетками. В частности, НЧ с $D_{HD} < 15$ нм активно выводятся из

организма почками, в то время как НЧ среднего размера (30-150 нм) обнаруживаются в костном мозге, сердце, почках и желудке. Наиболее крупные НЧ ($D_{HD} > 200-250$ нм) имеют тенденцию к удержанию в печени и селезенке [64]. С точки зрения EPR-эффекта оптимальными для накопления в опухоли по различным источникам являются НЧ размером от 20 до 150 нм [69], которые обеспечивают достаточное время циркуляции НЧ в кровотоке (часы), что повышает вероятность захвата опухолевыми клетками.

Тем не менее, несмотря на успешное нацеливание НЧ для избирательного уничтожения опухолевых клеток *in vitro*, медианное значение эффективности пассивной доставки НЧ *in vivo*, согласно литературным данным, не превышает 1% [75]. Таким образом, использование исключительно EPR-эффекта для доставки НЧ не всегда возможно вследствие варьирующейся проницаемости сосудов в различных типах опухолей, гетерогенности их микроокружения и т.д. [76]. Активная доставка представляет собой более выгодную альтернативу, основанную на повышении сродства к клеткам для НЧ при модификации их поверхности. Специфическое связывание НЧ основано на функционализации последних так называемыми векторными молекулами, комплементарными рецепторам (антигенам), экспрессирующимся на поверхности целевых клеток. В качестве векторов могут быть использованы антитела, аптамеры, белки, а также низкомолекулярные лиганды [77]. Взаимодействие модифицированных таким образом НЧ с клетками опухоли многократно усиливается, что, соответственно, повышает эффективность интернализации загруженных на них терапевтических препаратов [76]. Наиболее используемыми для этой цели являются доксорубин, паклитаксель, цисплатин, метотрексат, а также малые интерферирующие РНК (ми-РНК) [78]. Другой подход к активной доставке лекарств при помощи магнитных НЧ заключается в нацеливании последних при помощи градиентов внешнего МП, что позволяет добиться точной локализации загруженных лекарств в опухоли (один из примеров – магнитофекция [5]). МП может быть использовано не только для доставки препарата, но и его высвобождения из НЧ за счет эффекта гипертермии (например, при загрузке лекарства в термочувствительный полимер на поверхности магнитных НЧ [79]).

Тем не менее, распознавание лигандов на поверхности НЧ не произойдет до тех пор, пока последние не достигнут опухолевых клеток, а именно целевых антигенов на их поверхности. Обычно они расположены во внесосудистом пространстве опухоли [80]. Таким образом, пассивная и активная доставка дополняют друг друга, а эффективное нацеливание будет достигнуто при оптимизации времени циркуляции НЧ в кровотоке и для достижения ими клеток-мишеней под действием EPR-эффекта с последующим использованием аффинности лигандов на поверхности НЧ для связи с рецепторами [81].

1.2.4 Тераностика и мультимодальная визуализация

В широком смысле тераностикой называют комбинированную стратегию выявления и лечения заболеваний (преимущественно, онкологических), в ходе которой терапевтические агенты, адресно доставляемые в целевую область организма, также используются и для ее диагностики [71]. В данном «классическом» значении магнитные НЧ уже занимают существенную нишу в разработке агентов-тераностиков. Они могут быть легко визуализированы методом МРТ и применяться как инструмент для диагностики, в то время как загруженные на НЧ и доставленные в опухоль лекарственные средства обеспечивают терапевтическое воздействие [82]. Дополнительное использование в данной системе высокочастотного МП может приводить к эффекту гипертермии как таковому, либо применяться для повышения эффективности высвобождения терапевтических агентов с поверхности НЧ [4]. В то же время, в отличие от традиционных молекулярных контрастных и лекарственных веществ, новая концепция онкологической медицины, связанная с развитием нанотехнологии, стремится к созданию так называемых систем «все-в-одном» [83]. Подобные многофункциональные агенты способны одновременно диагностировать заболевания, адресно доставлять препараты, а также отслеживать реакцию организма на терапию. В одной из ключевых работ данной области [84] подчеркивается важность диагностической функции НЧ применительно к мониторингу терапевтического воздействия в трех направлениях: а) доставка лекарственного средства; б) его высвобождение и в) оценка эффективности лекарства. Оптимизация подобной трехуровневой визуализации в сочетании с терапевтической функцией в рамках одной наноструктуры должна обеспечивать обратную связь в режиме реального времени в отношении фармакокинетики препарата, его локализации в целевой области, а также побочного накопления (в здоровых клетках) [85].

Таким образом, понимание тераностики как неинвазивной визуализации процесса доставки лекарств в реальном времени с использованием НЧ является важной предпосылкой для прогнозирования и улучшения терапевтического результата применяемого лечения. Подобные исследования позволяют выбирать НЧ-носители, подходящие для длительной циркуляции и системного введения лекарств, а также те, которые более эффективно накапливаются в целевых тканях [86]. Наряду с успешной доставкой системы на основе НЧ в опухоль, также необходимо знать, насколько эффективно высвобождается загруженное лекарство. В то же время, во многих статьях, посвященных разработке новых материалов-носителей, сообщается только о кинетике высвобождения препаратов *in vitro*, что подтверждает саму концепцию, но не является

при этом строгим доказательством [4]. Визуализация и анализ кинетики высвобождения лекарств с поверхности НЧ в физиологических условиях *in vivo* в настоящее время остается актуальной проблемой.

За последние несколько десятилетий для получения анатомических/физиологических *in vivo* изображений у животных и человека были разработаны многочисленные методы визуализации. Они включают в себя уже упомянутую ранее МРТ, а также оптическую (ОВ) и фотоакустическую (ФАВ) визуализацию, позитронно-эмиссионную (ПЭТ) и компьютерную томографию (КТ) и многие другие [71]. Каждый метод имеет преимущества и недостатки. В частности, МРТ обладает исключительным пространственным разрешением, но невысокой чувствительностью. ОВ является очень чувствительным методом, однако не дает возможности получения изображений глубоко залегающих тканей вследствие рассеяния света. Аналогичным образом, КТ характеризуется высоким пространственным разрешением и низкой чувствительностью, тогда как в случае ПЭТ она очень высока, но при этом невозможно получить детальную анатомическую информацию [65]. В то же время, для адекватной диагностики онкологических заболеваний требуется сочетание высокого анатомического разрешения и чувствительности на молекулярном уровне, что стимулирует поиск подходов к комбинации различных способов визуализации.

С целью преодоления существующих ограничений отдельных методов в настоящее время активно разрабатываются так называемые комбинированные контрастные агенты для мультимодальной визуализации на основе наноструктур (нанозондов) [5]. Безусловно, одним из наиболее перспективных объектов для создания подобных нанозондов являются магнитные НЧ. Помимо изначально присущих им МРТ-контрастных свойств, в литературе описано множество примеров использования магнитных НЧ для комбинации таких способов визуализации, как МРТ и КТ, МРТ и ПЭТ [87] и т.д. Особого интереса заслуживает возможность введения на поверхность магнитных НЧ флуоресцентных молекул для создания оптического контраста. Метод ОВ основан на поглощении молекулами флуорофора квантов света и последующим испусканием фотонов с большей длиной волны по сравнению с исходными [88]. Как правило, используются флуоресцентные агенты, излучающие фотоны с длиной волны в ИК-диапазоне (650-900 нм) вследствие их высокой способности проходить через биологические ткани. В случае грызунов и мелких млекопитающих это позволяет проводить визуализацию всего тела, что является основой технологии *in vivo* флуоресцентной визуализации (IVIS). Кроме того, ОВ выгодна с экономической точки зрения, а также в отличие от ПЭТ не требует использования ионизирующего излучения [89].

Учитывая невысокую чувствительность МРТ, большое количество исследований посвящено дополнению этого метода ОВ [90]. В частности, сочетание предоперационной анатомической информации, полученной методом МРТ, а также интраоперационной – на молекулярном уровне, что обеспечивается флуоресцентной ОВ, может помочь хирургам точнее определять границы опухолевого очага [48]. Наиболее используемыми для этой цели флуоресцентными красителями являются родамин В, флуоресцеин изотиоцианат (FITC), а также цианины (Cy5, Cy5.5) [90]. Конъюгация последних с НЧ магнетита [91] обеспечила сочетание эффективного МРТ- и оптического контрастирования на моделях опухолей мыши.

1.2.5 Магнито-механическое управление активностью клеток и биомакромолекул

В течение последних десятилетий эффекты механических деформаций на структуру и химические свойства клеток, а также отдельных биомакромолекул были успешно исследованы с использованием современных технологий [92–94]. Одним из примеров таких механохимических подходов является силовая спектроскопия одиночных молекул. Данный метод дает возможность количественно измерять силы и деформации, влияющие на биохимические свойства как субклеточных структур в клетках [92–94], так и единичных биомакромолекул, в частности, ферментов [95–98]. Было установлено, что критические силы, вызывающие изменения наиболее важных биохимических процессов, находятся в диапазоне от единиц до сотен пН [92,94,96,99,100]. Помимо изучения ответных реакций биомакромолекул на приложенные силы и определения критических значений последних, механохимические подходы могут потенциально использоваться в различных областях биоинженерии и наномедицины. Однако возможность дистанционного применения механохимического подхода в его традиционном понимании отсутствует.

В качестве альтернативы для удаленного воздействия на клетки и биомакромолекулы, а также введенные в живые системы извне нано- и микрочастицы потенциально могут использоваться ультразвуковое, ионизирующее или лазерное облучение, а также МП. Именно последний вариант получил наибольшее распространение в исследованиях [66]. При этом значительная часть ранних усилий была сосредоточена на использовании радиочастотного МП и магнитных НЧ в ГМЧ, речь о которой уже шла ранее. В последнее время, однако, все более активно изучаются именно магнито-механические эффекты, производимые магнитными НЧ в переменном МП значительно меньшей частоты (1-100 Гц) при отсутствии нагрева [101–103]. Теоретически

показано, что в однородном МП с плотностью потока 50-300 мТл НЧ Fe_3O_4 диаметром 20-30 нм могут генерировать силы в диапазоне от 0,1 до 1000 пН [98,104,105]. При этом нагрев НЧ в таких полях пренебрежимо мал ($<10^{-4}$ - 10^{-6} °C), а основное возможное воздействие магнитных НЧ связано с созданием момента силы при их вращательном колебательном движении [106]. Оно способно создавать значительные деформации (растяжение, сжатие, сдвиг, кручение) в прикрепленных к НЧ клетках и биомакромолекулах, в результате чего первые могут изменять свой метаболизм, функции и жизнеспособность, а последние – активность. В литературе было продемонстрировано, что при оптимизации размера и магнитных свойств НЧ можно избирательно манипулировать всеми механочувствительными структурами клеток, включая сам цитоскелет, интегрины и ферменты киназного типа, механо-чувствительные ферменты (связанные с мембраной и цитоскелетом), а также механо-чувствительные ионные каналы (через деформацию клеточной мембраны) [101,107,108]. Таким образом, подобные исследования существенно расширяют область нанотоксикологии, а также дают новые возможности для наномедицины и области доставки лекарств.

Первой работой в области применения магнито-механического подхода к ферментам и изменению их каталитической активности является статья [103], авторы которой обнаружили возможность дистанционного регулирования активности α -химотрипсина и β -галактозидазы при помощи низкочастотного негреющего МП. Для этого были синтезированы коллоидные кластеры путем покрытия НЧ Fe_3O_4 (диаметром от 7 до 12 нм) анионными блок-сополимерами поли(этиленгликолем)-b-полиакрилатом или поли(этиленгликолем)-b-полиметакрилатом. Каждый кластер содержал до 10-15 НЧ, электростатически связанных и сшитых сополимерами. На НЧ были иммобилизованы молекулы ферментов путем образования пептидной связи между их аминокетильными группами и карбоксильными группами полимерных цепей. Эффекты МП изучались с использованием двух установок. В одной из них создавалось МП с параметрами, типичными для ГМЧ (амплитуда $B = 26,4$ мТл, частота $f = 337$ кГц). Другая использовалась для приложения низкочастотного МП (B до 250 мТл, f от 10 до 100 Гц), которое было равномерным (т.е. с нулевым градиентом) во всем объеме образца. Однородность поля обеспечивала: а) идентичные условия поля во всем объеме образца и б) преобладающее влияние вращательного момента, создаваемого НЧ и их пренебрежимо малое поступательное движение. Кроме того, область инкубации ферментов на НЧ и катушка индуктивности эффективно термостатировались, что обеспечивало постоянную температуру во время эксперимента.

В результате было обнаружено, что воздействие МП как низкой, так и высокой частоты приводило к снижению каталитической активности ферментов, иммобилизованных в кластерах НЧ Fe_3O_4 . Интересно, что эффект инактивации был наибольшим, когда МП прикладывалось импульсами длиной в 2-3 мин, а не непрерывно при одинаковой общей продолжительности.

Описанные исследования дали веские аргументы в поддержку нетеплового механизма инактивации ферментов. Во-первых, эксперименты проводились при температуре от 20 до 25°C, и ее изменение в самом объеме образца было незначительным. Во-вторых, по результатам измерений в отсутствие поля инактивация ферментов, иммобилизованных данных НЧ, наблюдалась только при 45-50°C. В-третьих, само по себе воздействие низкочастотного МП ($f \leq 100$ Гц) не могло привести к эффекту локального нагрева. В-четвертых, эффект снижения каталитической активности фермента увеличивался по мере увеличения числа точек его прикрепления к НЧ, что больше соответствует механическому, а не термическому механизму инактивации. Наконец, методом кругового дихроизма было показано, что импульсное воздействие МП приводило к изменениям вторичной структуры иммобилизованного фермента, которые сильно отличались от наблюдаемых при тепловой денатурации того же образца [103].

Наблюдаемые явления предполагают возможность трансформации энергии негреющего МП в механические деформации биомакромолекул, иммобилизованных на магнитных НЧ [104,109]. В частности, переориентация последних вдоль направления вектора индукции МП может привести к напряжениям в полимерных цепях, связанных с НЧ. Если данная цепь одновременно прикреплена к двум НЧ в составе кластера, то она может испытывать растягивающие, сжимающие и скручивающие силы, генерируемые исключительно за счет действия МП. В свою очередь, биомакромолекулы, иммобилизованные на НЧ через полимерные цепи, могут подвергаться растягивающей, компрессионной, скручивающей и сдвиговой деформации (в зависимости от взаимной ориентации магнитных моментов осциллирующих НЧ, направления вектора магнитной индукции МП и количества точек прикрепления биомакромолекул к НЧ). Теоретические оценки показывают, что в данной системе могут возникать силы вплоть до сотен пН, вызывающие деформации до десятков нм. Недостатками вышеописанной реализации магнитно-механического подхода является нековалентная связь молекул полимера с НЧ, а также большая длина углеводородной цепи, необходимая для эффективной стабилизации НЧ Fe_3O_4 и малый диаметр последних. В совокупности это ограничивает передаваемые на молекулы ферментов механические эффекты и требует оптимизации размера НЧ, а также свойств их поверхности.

1.3 Оптимизация свойств наночастиц для биомедицинского применения

В данной главе будут рассмотрены основные свойства магнитных НЧ, которые необходимо принимать во внимание при дизайне материалов для дальнейшего применения в области биомедицины (см. главу 1.2). К одним из ключевых параметров относится размер магнитного ядра НЧ, а также его оптимальные магнитные характеристики (различные, однако, для МРТ и ГМЧ). Не менее важным является гидродинамический размер НЧ в растворе, их заряд и характер покрытия. Наконец, полученные материалы должны обладать минимальной токсичностью для целевых клеток и тканей, о чем также пойдет речь ниже.

1.3.1 Ключевые параметры наночастиц для усиления контраста в МРТ

Магнитные свойства НЧ оказывают сильное влияние на их контрастный эффект, поскольку поперечная R_2 -релаксивность пропорциональна квадрату их магнитного момента μ (формула 4). Намагниченность насыщения M_s также зависит от многих факторов, таких как размер, состав и форма НЧ. Все эти аспекты необходимо принимать во внимание при дизайне магнитных НЧ в качестве контрастных агентов для МРТ.

В первую очередь, многими группами изучалось влияние на величину R_2 размера НЧ [110–112]. Снижение диаметра последних до 5 нм и ниже приводит к сильному уменьшению μ , активизации поверхностного разупорядочения спинов и резкому снижению R_2 . Согласно формуле (4), R_2 пропорциональна квадрату μ НЧ (связанного с M_s) и обратно пропорциональна радиусу НЧ. В свою очередь, μ пропорционален объему НЧ, поэтому результирующая величина R_2 -релаксивности увеличивается с ростом диаметра НЧ. В случае сферических НЧ на основе оксидов железа, максимальная скорость поперечной релаксации была получена для НЧ Fe_3O_4 и $\gamma-Fe_2O_3$ диаметром 27 и 25 нм, соответственно [113]. Стоит отметить, что существующие химические методы синтеза крайне редко позволяют получать НЧ магнитных оксидов диаметром более 20 нм с узким распределением по размерам [31]. Кроме того, в этом диапазоне размеров НЧ могут находиться в пограничном состоянии между ферромагнитным и суперпарамагнитным режимами, в связи с чем дипольные взаимодействия часто вызывают агрегацию. В свою очередь это увеличивает релаксивность НЧ и влияет на их общую коллоидную стабильность. В связи с этим важно отметить, что значения релаксивности в целом нужно соотносить со средним гидродинамическим радиусом НЧ R_{HD} в коллоидном растворе, а не с размером их магнитного ядра. Таким образом, установление оптимального значения

диаметра НЧ для достижения максимальных значений R_2 является непростой задачей, так как данная величина сильно зависит от коллоидной стабильности НЧ и их кластеризации (возможного образования агрегатов).

Вторым возможным подходом к увеличению R_2 является повышение M_s НЧ. В литературе чаще всего оно достигается путем создания композиционных материалов на основе ферритов состава MFe_2O_4 (где $M = Co, Ni, Mn$) [114]. Однако, несмотря на эффективность такого способа для увеличения контрастных свойств, в итоге он снижает биосовместимость НЧ. В-третьих, значения R_2 -релактивности могут быть оптимизированы путем изменения формы НЧ, так как их M_s непосредственно связана с эффективной анизотропией НЧ, которая будет меняться за счет добавления анизотропии формы. Подобные наблюдения были сделаны в работах [110,112], авторы которых обнаружили более высокие значения релаксирующей способности ограненных НЧ по сравнению со сферическими. Аналогично, рекордные значения релаксивности НЧ Fe_3O_4 были получены для нанокубов диагональю 22 нм ($R_2 = 761 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ при 3 Тл) [115], а также октапедов с длиной грани 30 нм ($R_2 = 679,3 \pm 30 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ при 7 Тл) [116]. Важно отметить, что внешние магнитные поля, используемые в клинических МР-томографах, составляют в основном 1,5 и 3 Тл, но также доступны и приборы, генерирующие МП индукцией 7 Тл.

Состояние агрегации (кластеризации) НЧ, которое может быть выявлено путем сравнения размера магнитного ядра по данным ПЭМ и D_{HD} (полученного, например, методом динамического рассеяния света (DLS)), также влияет на производительность НЧ как контрастных агентов (формула 4). Данный эффект привел к новой стратегии увеличения R_2 , заключающейся в формировании/ синтезе агрегатов или кластеров контролируемого размера [117]. Они могут рассматриваться как магнитные сферы, в которых взаимодействия между НЧ создают сильные градиенты МП и, следовательно, ускоряют T_2 -релаксацию.

Корреляция R_2 -релаксивности с диаметром НЧ Fe_3O_4 или их агрегатов широко обсуждается в литературе [3,62,71], при этом можно выделить три различных режима. Для НЧ относительно небольшого размера предсказывается так называемый режим усреднения по движению (MAR), в котором диффузия молекул воды вблизи НЧ происходит гораздо быстрее по сравнению со сдвигом резонансной частоты, что приводит к росту R_2 -релаксивности с увеличением размера НЧ [113]. Например, в ряду НЧ Fe_3O_4 диаметром 4, 6, 9 и 12 нм наблюдался последовательный рост значений R_2 (78, 106, 130 и $218 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, соответственно [118]). При дальнейшем увеличении размера НЧ индуцированное возмущающее МП вокруг них становится намного сильнее, а процесс диффузии протонов перестает быть доминирующим для спада сигнала. Это состояние

называется режимом статической дефазировки (SDR) [119], в котором значение R_2 выходит на плато. В частности, при 7 Тл значения релаксивности возрастали с 173 до 204 и 240 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ для НЧ диаметром 8, 23 и 37 нм, соответственно. Однако при дальнейшем росте НЧ (65 нм) величина R_2 увеличивалась лишь незначительно и составляла 249 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ [120]. Наконец, если размер агрегатов НЧ превышает некое критическое значение, R_2 -релаксивность начинает падать, что соответствует режиму ограниченного эха (ELR).

Таким образом, контрастный эффект магнитных НЧ определяется не только исходными свойствами их ядра, но и скоростью диффузии молекул воды в градиенте МП вокруг НЧ. В свою очередь, диффузионные процессы зависят от характера покрытия НЧ. Так, вследствие природы и структуры органических молекул (например, полимеров), молекулы воды могут оттесняться из области магнитного ядра, а их приближение – замедляться или же, напротив, покрытие НЧ может удерживать молекулы H_2O вблизи себя. В результате выявляется еще один фактор, определяющий R_2 -релаксивность – стабилизирующие лиганды на поверхности НЧ. Так, полимерные цепи полиэтиленгликоля (ПЭГ) и его производных, использующихся для функционализации магнитных НЧ, обычно связаны с двумя или тремя молекулами воды, что замедляет их диффузию и приводит к увеличению R_2 -релаксивности [121]. Напротив, покрытие, состоящее из гидрофобных полимеров, уменьшает скорость поперечной релаксации [122]. Разумеется, оптимальное покрытие должно обеспечивать компромисс между удерживанием молекул H_2O в течение времени, достаточного для их релаксации в МП НЧ и, в то же время, обеспечением достаточно быстрого обмена для увеличения общего количества молекул воды, циркулирующих вблизи НЧ. Тем самым, толщина покрытия может также влиять на свойства НЧ в МРТ. В частности, увеличение длины полимерных цепей [123] или толщины оболочки диоксида кремния [124] может привести к уменьшению R_2 -релаксивности. Напротив, в случае НЧ Fe_3O_4 , покрытых рН-чувствительным гидрогелем [119], было показано, что увеличение толщины его слоя увеличивает значение R_2 . При определенном значении рН гидрогель набухает, в результате чего большее количество молекул H_2O диффундирует вблизи магнитного ядра.

Таким образом, для использования в качестве контрастных агентов магнитные НЧ должны обладать высокой намагниченностью насыщения и эффективной анизотропией, а также быть функционализированы лигандами, способствующими диффузии воды вблизи магнитного ядра (при этом оптимальный гидродинамический размер НЧ составляет 50 – 100 нм). Кроме того, управляемая агрегация магнитных НЧ может повысить значения R_2 -релаксивности, однако ее зависимость от размера имеет немонотонный характер. Все эти факторы необходимо учитывать при дизайне НЧ для целей МРТ.

1.3.2 Основные параметры наночастиц для выделения тепла в ГМЧ

Тепловыделительные свойства НЧ в ГМЧ (величины SLP) в основном определяются их магнитными характеристиками. В пункте 1.3.1 было показано, что на контрастные свойства НЧ в МРТ в значительной степени влияет их M_s . Эффективность НЧ в ГМЧ, в свою очередь, обуславливается анизотропией НЧ, их температурой блокировки T_B , а также временами Неелевской и Брауновской релаксации (формулы 6, 7). Тем не менее, прочие параметры, такие как диаметр НЧ или природа покрытия их поверхности, также оказывают воздействие на SLP, о чем и пойдет речь далее.

Размер магнитного ядра, а именно то, является ли оно одно- или многодоменным, имеет ключевое значение. Для НЧ диаметром более 100 нм, магнитные моменты которых находятся в заблокированном состоянии, преобладают гистерезисные потери. Напротив, у НЧ меньшего размера тепловыделение в МП происходит за счет релаксационных процессов, при этом преобладание того или иного механизма релаксации (по Неелю/Брауну), зависит от анизотропии НЧ. Ее увеличение снижает критический размер перехода НЧ от Неелевской к Брауновской релаксации [3]. Этот параметр следует учитывать при оценке тепловыделительных свойств НЧ в биологических средах при интернализации клетками, поскольку в случае повышенной вязкости механизм Брауна может блокироваться (формула 6). В то же время, покрытие на поверхности НЧ и зависящий от него гидродинамический размер также влияют на процесс Брауновской релаксации и последующее рассеяние тепла в среде [125]. Согласно имеющимся данным, с точки зрения размера магнитного ядра для ГМЧ наилучшим вариантом являются НЧ, находящиеся максимально близко к границе перехода от суперпарамагнитного к ферромагнитному состоянию [126]. Тем не менее, вследствие варьирующихся в работах физических свойств синтезированных НЧ, оптимальные экспериментальные значения колеблются от 12 до 25 нм [112,127]. В первую очередь, от метода синтеза зависят магнитные характеристики НЧ [128]. Помимо среднего диаметра, на значении SLP существенным образом сказывается и распределение НЧ по размеру, при этом даже небольшое увеличение полидисперсности значительно снижает эффективность нагрева НЧ в МП [129]. Максимальным опубликованным значением SLP, измеренным в клинически допустимых МП ($B \cdot f < 4,85 \cdot 10^8 \text{ А} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), является величина для химически синтезированных НЧ Fe_3O_4 диаметром 30 нм, которая составляет $600 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$ при 400 кГц и $10,3 \text{ кА} \cdot \text{м}^{-1}$ [3]. Однако полученные значения SLP далеки от присущих магнитосомам, синтезируемым бактериями ($\text{SLP} = 960 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$ при 410 кГц и $9,9 \text{ кА} \cdot \text{м}^{-1}$), которые по-прежнему недостижимы в условиях химических лабораторий [130].

Из экспоненциальной зависимости времени Неелевской релаксации от константы анизотропии K (формула 7) очевидно, что сильное влияние на процессы тепловыделения оказывает эффективная анизотропия НЧ. В основном она является суммой магнитокристаллической анизотропии, анизотропии формы и поверхностных эффектов. Следовательно, для повышения SLP за счет увеличения эффективной анизотропии НЧ можно использовать две основные стратегии: изменение кристаллической анизотропии самого материала, либо изменение его формы.

Кристаллическая анизотропия каждого вещества является неизменным параметром, следовательно, на нее можно влиять только путем варьирования структуры НЧ и их композиционного состава. Fe_3O_4 имеет самую высокую анизотропию среди оксидов железа ($11-14 \text{ кДж} \cdot \text{м}^{-3}$), в то время как $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – только $4,6 \text{ кДж} \cdot \text{м}^{-3}$ [3]. Значение анизотропии может быть увеличено путем легирования НЧ переходными металлами (Co, Ni, Mn). Тем не менее, развитие данного направления ограничено вследствие снижения биосовместимости и сложности синтеза, приводящего обычно к структурам типа «ядро-оболочка» и неоднородности НЧ по химическому составу [131].

С другой стороны, повышение эффективной анизотропии может также являться следствием изменения формы НЧ со сферической на ограниченную за счет увеличения площади поверхности и усиления роли поверхностных эффектов. Вариации окружения и взаимной ориентации атомов на поверхности ведут к изменениям локальной намагниченности. Для ограниченных НЧ в ненулевом МП движение доменной стенки будет ориентировано на формирование плоских доменов для минимизации энергии, что увеличивает поверхностную анизотропию [132]. Кроме того, кубическая форма НЧ приводит также к уменьшению кантинга спинов по сравнению со сферическими [127]. Соответственно, было обнаружено, что ограниченные НЧ имеют большие значения SLP, чем их сферические аналоги аналогичного размера [110,127]. В частности, кубические НЧ Fe_3O_4 размером 19 нм обладают одним из самых высоких SLP, когда-либо встречавшихся в литературе ($2453 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$ при $29 \text{ кА} \cdot \text{м}^{-1}$ и 520 кГц) [127].

Кажется очевидным, что рост анизотропии НЧ увеличивает время их Неелевской релаксации и, следовательно, усиливает тепловыделение; тем не менее, это не всегда справедливо. Как было показано в работе [133], значение SLP для НЧ со структурой «ядро-оболочка» увеличивалось с ростом анизотропии, после чего выходило на плато или даже снижалось. Влияние данного фактора еще сложнее предсказать, когда расстояние между НЧ уменьшается (например, при их высокой концентрации), поскольку теория SLP относится только к отдельным НЧ.

Известно, что потери тепла в ГМЧ снижаются вследствие дипольных взаимодействий при высокой концентрации НЧ [134]. В то же время, именно они требуются для достижения терапевтического эффекта в области, ограниченной опухолью. Ключевую роль в этом случае играет контролируемая агрегация НЧ. Так, в работе [135] было обнаружено, что структуры типа «наноцветы», состоящие из агрегатов с определенной кристаллографической ориентацией НЧ, демонстрировали так называемое коллективное поведение, что увеличивало значения SLP. Напротив, в случае «независимых» НЧ, стабилизированных в растворе в виде агрегатов, величины SLP снижались [136]. Эффект влияния концентрации НЧ на процессы тепловыделения неоднозначен. В целом, когда доминирующей является релаксация по Неелю, SLP уменьшается с увеличением концентрации, в то время как преобладание Брауновской релаксации приводит к противоположной тенденции. Например, в работе [137] сообщается об отсутствии зависимости SLP от концентрации агрегатов НЧ в диапазоне 6-300 мг·мл⁻¹, т.е., изменение концентрации влияло только на расстояние между агрегатами, а структура последних и расстояния между самим НЧ остаются неизменными. Напротив, авторы статьи [138] наблюдали прямую корреляцию между концентрацией и SLP. В частности, при высоких концентрациях происходило образование цепочек из НЧ, обладающих одноосной анизотропией аналогично магнитосомам в бактериях [130]. В работе [139] было показано, что формирование цепочек особенно выгодно для нанокубов.

Еще одним фактором, от которого зависит мощность тепловыделения, является вязкость среды. В частности, значения SLP, полученные в смеси глицерин: вода или агарозном геле, были значительно ниже по сравнению с водными растворами [126,137]. Снижение SLP на 50-90% также было обнаружено в условиях *in vitro* в условиях вязкости цитоплазмы [140]. Аналогичные результаты наблюдались как для НЧ, связанных с клеточной мембраной, так и при их интернализации. Наблюдаемые эффекты приписываются подавлению, либо значительному увеличению времени Брауновской релаксации с ростом вязкости среды. С другой стороны, в работе [141] было продемонстрировано, что изменение SLP в первую очередь связано с агрегацией НЧ при их взаимодействии с клетками, нежели чем сама по себе вязкость клеточной среды.

Таким образом, для достижения наилучших тепловыделительных характеристик в ГМЧ размер НЧ должен находиться на границе ферромагнитного и суперпарамагнитного состояния. При этом НЧ должны обладать высокой эффективной анизотропией, повышать которую можно при легировании ионами переходных металлов, либо изменении формы НЧ от сферической к ограненной, а также за счет контролируемой агрегации. Кроме того, необходимо учитывать изменения свойств НЧ в условиях инкубации с клетками.

1.3.3 Функционализация и свойства поверхности наночастиц

1.3.3.1 Оптимизация свойств для *in vivo* применения

Помимо оптимизации магнитных НЧ преимущественно в плане качества самого материала и его физических характеристик, на каждом этапе дизайна необходимо учитывать также физико-химические свойства НЧ в контексте их дальнейшего попадания в организм с целым рядом биологических барьеров, затрудняющих достижение надлежащих терапевтических и диагностических результатов. В связи с этим на первый план выходят такие принципиально важные факторы, как время циркуляции НЧ в кровотоке, эффективность их интернализации клетками, а также побочное накопление в нецелевых органах [74,76]. Как уже упоминалось ранее, в подавляющем большинстве случаев опухоли достигают не более 5% от введенной дозы НЧ, в то время как основная часть накапливается в здоровых тканях, вызывая побочные эффекты [75]. В литературе был сделан вывод, что решением данной проблемы может стать именно оптимизация физико-химических свойств НЧ, таких как размер, форма, химия поверхности и поверхностный заряд [5]. В то время как первые два фактора уже упоминались ранее (пункт 1.2.3), последние два параметра будут рассмотрены ниже.

В первую очередь, свойства поверхности НЧ должны быть подобраны таким образом, чтобы продлить время циркуляции в крови наночастиц путем обхода клеток ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), в частности, макрофагов печени, селезенки, костного мозга и лимфатических узлов. Для этого важно сохранить исходные физико-химические свойства НЧ, не допустив адсорбции белков сыворотки крови на их поверхности, как минимум, в течение часов/ суток после введения в биологическую среду. Именно подобная опсонизация (покрытие белками-опсонинами, включающими сывороточный альбумин, аполипопротеины и иммуноглобулины) приводит к секвестрации магнитных НЧ органами РЭС, катастрофически снижая эффективность доставки в опухоль [64]. Несмотря на то, что к образованию подобной белковой короны приводит множество факторов, исследователями выделяются два основных – гидрофобные взаимодействия и заряд поверхности НЧ.

Поверхностный заряд количественно измеряется как потенциал двойного электрического слоя на границе НЧ с внешней средой (ζ -потенциал). С одной стороны, положительно заряженные магнитные НЧ в биологических средах более склонны к образованию агрегатов и лучше взаимодействуют с отрицательно заряженными клеточными мембранами, повышая эффективность интернализации. С другой стороны, в

большинстве литературных источников считается, что отрицательный заряд на поверхности НЧ приводит к значительному уменьшению адсорбции белка; следствием этого является низкий захват макрофагами и более длительное время циркуляции НЧ в крови [69]. Что касается гидрофобных взаимодействий, исследователями было продемонстрировано, что НЧ с гидрофобной поверхностью гораздо интенсивнее подвергаются опсонизации по сравнению с гидрофильными аналогами. Кроме того, гидрофобные взаимодействия приводят к низкой диспергируемости НЧ в водных растворах, агрегации и ухудшению магнитных свойств [72]. Следовательно, в случае гидрофобных НЧ необходимо использование различных защитных оболочек.

1.3.3.2 Модификация поверхности наночастиц путем покрытия оболочкой

Покрытие магнитных НЧ защитной оболочкой является одним из наиболее надежных методов обеспечения их биосовместимости для *in vitro* и *in vivo* применений. С точки зрения химии поверхности такая оболочка должна сохранять возможность дальнейшей модификации различными функциональными лигандами, повышать растворимость НЧ, предотвращать их агрегацию, окисление и захват клетками РЭС [5]. Кроме того, многие методы синтеза позволяют получать только гидрофобные НЧ, которые необходимо переводить в водную фазу [142]. Наиболее распространенными подходами являются покрытие НЧ полимерами, диоксидом кремния, а также золотом.

Полимерное покрытие является одним из наилучших вариантов для обеспечения биосовместимости магнитных НЧ и их способности преодолевать биологические барьеры. Кроме того, за счет наличия карбокси-, amino- или тиольных групп, полимеры на поверхности НЧ могут быть в дальнейшем использованы для введения различных функциональных молекул, в том числе терапевтических препаратов, меток для визуализации или нацеливающих агентов [143]. Природные полимеры, такие как декстран, хитозан и т.д., являются выгодными с точки зрения биосовместимости и биodeградируемости, однако не всегда обеспечивают контролируемое высвобождение загруженных веществ [144]. К наиболее используемым синтетическим полимерам относится ПЭГ и его производные (сополимеры), которые являются нетоксичными и существенно повышают время циркуляции НЧ в кровотоке, обеспечивая их гидрофильность. Также оболочка ПЭГ с легкостью позволяет проводить загрузку различными препаратами, а также обеспечивать требуемый для конкретных целей профиль их высвобождения [145]. Кроме того, если НЧ после синтеза стабилизированы гидрофобными молекулами (например, олеиновой кислотой), производные ПЭГ,

содержащие как гидрофильные, так и гидрофобные участки, могут успешно применяться для перевода НЧ в водную фазу. В частности, для этой цели используются блок-сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида из ряда Pluronic, либо производные полиэтиленгликоля и фосфолипида, например, ДСПЭ-ПЭГ (1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-карбоксиполиэтиленгликоль) [38].

Покрытие НЧ диоксидом кремния SiO_2 эффективно сохраняет их первоначальные свойства, а также может служить способом перевода в водную фазу [146]. На поверхности SiO_2 в водном растворе находятся гидроксильные группы, обеспечивающие его гидрофильность и возможность дальнейшей функционализации НЧ. Оболочка из диоксида кремния устойчива к нагреванию, а также в кислой среде и обладает высокой удельной площадью поверхности. НЧ, покрытые SiO_2 , отрицательно заряжены в плазме крови, что позволяет им избегать агрегации [147]. Благодаря наличию на поверхности силановых групп ($-\text{Si}-\text{OH}$) такая оболочка легко поддается дальнейшей функционализации. В последние годы внимание исследователей в основном сосредоточено на получении многофункциональных композитов магнитных НЧ и мезопористого диоксида кремния, которые привлекательны с точки зрения последующей высокой загрузки лекарства и его высвобождения под действием внешних стимулов, например, нагрева или изменения pH [146].

Существенным недостатком данного подхода является то, что при покрытии SiO_2 , как правило, на НЧ наносится оболочка большой толщины [148]. Это увеличивает совокупный размер НЧ и приводит к их неспецифическому поглощению со стороны РЭС. Тем не менее, в отдельных работах сообщается об успешном получении НЧ диаметром менее 100 нм [149]. Кроме того, покрытие SiO_2 неустойчиво в щелочных средах, а также не препятствует диффузии кислорода к магнитному ядру вследствие наличия пор в аморфном слое. Несмотря на то, что диоксид кремния является биосовместимым, он не является биodeградируемым [5].

Наконец, последним среди наиболее распространенных вариантов покрытия является золотая оболочка из золота. С одной стороны, его низкая реакционная способность надежно защищает магнитное ядро от окисления [150]. Кроме того, золото признано нетоксичным и обладает определенными особенностями химии поверхности, что делает его идеальным материалом для конъюгации с различными биомолекулами [36] и органическими лигандами (в том числе, бифункциональными) за счет ковалентной связи $\text{Au}-\text{S}$ с тиольными ($-\text{SH}$) и дисульфидными ($-\text{S}-\text{S}-$), с энергией 40 ккал/моль. С другого конца такого лиганда может находиться другая функциональная группа ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{Cl}$ и т.д.), что делает возможным дальнейшее связывание с ней белков, ДНК и других

НЧ [151]. Покрытие НЧ золотой оболочкой сохраняет их магнитные свойства [44] и существенно расширяет спектр возможных применений в биомедицине (в частности, за счет явления ППР и высокой рентгеновской плотности), о чем пойдет речь в главе 1.4. Пожалуй, единственным недостатком золотого покрытия является трудность его нанесения по причине существенных отличий в природе и структуре по сравнению с магнетитом [36]. Тем не менее, как обсуждалось в главе 1.1, перечень возможных методов синтеза НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ со структурой «ядро-оболочка» постоянно пополняется.

1.3.4 Токсичность материалов на основе магнитных наночастиц

Несмотря на постоянно растущее число исследований, доклинических и клинических испытаний магнитных НЧ для применения в биомедицине, вопросы, связанные с их токсичностью, по-прежнему остаются актуальными. С целью изучения токсикологического профиля магнитных НЧ в настоящее время используют различные *in vitro* и *in vivo* модели [64]. Исследования показывают, что среди всех магнитных материалов, таких как чистые металлы, биметаллические сплавы и оксиды металлов, НЧ магнетита/ маггемита обладают наибольшей биосовместимостью [4]. В частности, считается, что в концентрациях $<100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ НЧ Fe_3O_4 проявляют минимальную цитотоксичность или ее полное отсутствие, а также при покрытии полимерной оболочкой не обладают системной токсичностью *in vivo* [65]. Кроме того, НЧ Fe_3O_4 являются биodeградируемыми и могут частично выводиться из организма через почки, а после деградации в печени полученное железо используется в синтезе эритроцитов. В ходе клинических испытаний МРТ-контрастного агента Feraheme (с размером НЧ 30 нм) у более чем 2000 онкобольных пациентов (метастазирование лимфатических узлов) было показано, что безопасная доза для введения в организм составляет 2,9 мг Fe/ кг веса, при этом НЧ, помимо лимфатических узлов, захватывались также макрофагами печени и селезенки [69]. В целом вводимая человеку доза НЧ в клинике (0,56 – 3 мг Fe/ кг) намного меньше, чем нормальная концентрация Fe в крови ($\approx 33 \text{ мг Fe/ кг}$) и общее количество железа в организме ($\approx 3500 \text{ мг}$) [64]. Таким образом, НЧ на основе Fe_3O_4 , по-видимому, являются наиболее перспективным материалом для использования в целях визуализации, диагностики, терапии и тераностике.

Тем не менее, стоит отметить, что в концентрациях выше $100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ НЧ Fe_3O_4 возможно проявление различных механизмов токсичности, таких как воспаление, образование апоптотических телец, нарушение функции митохондрий (метод оценки – MTS-тест), мембранная утечка лактатдегидрогеназы (LDH-тест), генерация активных

форм кислорода (АФК, детектируемая при помощи специальных флуоресцентных маркеров), увеличение количества микроядер (показатель повреждения хромосом, маркер генотоксичности), и т.д. [152] Справедливости ради стоит отметить, что токсичность многих модифицированных НЧ не может быть вызвана не самим магнитным ядром, а в большей степени покрытием, которое приводит к агрегации НЧ, делая их нестабильными в биологических средах и сыворотке. При этом любые агрегаты НЧ, независимо от их состава, являются токсичными для клеток и тканей [65].

Что касается токсичности золотых НЧ, большинство исследователей считают их нетоксичными вследствие инертности. Так, в работе [153] НЧ Au размером от 4 до 18 нм, модифицированные цитрат-ионами, цистеином, глюкозой или биотином в концентрациях до 0,25 мкМ были нетоксичны для клеток костного мозга человека. Тем не менее, существуют данные, говорящие о токсичности НЧ золота, зависящей от их размера, природы лиганда на поверхности, исследуемой клеточной линии. Так, в статье [154] была обнаружена токсичность золотых НЧ субнанометрового диаметра для клеток HeLa в концентрации до 5,6 мкМ, в то время как НЧ размером 15 нм оказались нетоксичны. В работе [155] НЧ золота размером 33 нм являлись нетоксичными для клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека вплоть до концентрации 120 нМ, однако вызывали дозозависимую смерть клеток бронхогенной карциномы. По-видимому, потенциальные токсичные эффекты, связанные с НЧ золота, необходимо оценивать отдельно в каждом конкретном случае.

НЧ магнетит-золото в литературе считаются нетоксичными. Так, в статье [156] для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ размером 50 нм, стабилизированных цитрат-ионами, выживаемость клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека составляла более 90% вплоть до концентрации НЧ 2 мг/мл. В работе [157] выживаемость клеток HeLa, подвергавшихся воздействию НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в концентрации до 1 мг/мл размером 5-6 нм, стабилизированных глюкозой/цитрат-ионами/ ПЭГ, составляла более 80%. Помимо этого, авторы исследовали интернализацию НЧ клетками, установив их прохождение через мембрану без нарушения целостности цитоскелета. Наиболее комплексной работой в данном направлении является статья [158], в которой токсичность НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ размером 35 нм, стабилизированных цитрат-ионами, исследовалась как *in vitro*, так и *in vivo*. Было выявлено, что при инкубации НЧ с фибробластами мыши в течение 24 ч выживаемость клеток вплоть до концентрации частиц 1 мг/мл составляла более 75%. Средняя летальная доза НЧ при их введении мышам в хвостовую вену составила 8,39 г/кг веса. При изучении острой токсичности НЧ в концентрации 0,1 г/кг веса на гончих собаках не было обнаружено побочных эффектов (снижения аппетита, потери веса, изменений в поведении и т.д.).

Таким образом, оптимальным вариантом для *in vivo* применения являются гидрофильные отрицательно заряженные НЧ с невысоким по модулю ζ -потенциалом, обеспечивающие достаточное время циркуляции в кровотоке и эффективно подвергающиеся эндоцитозу целевыми клетками. Для достижения данных параметров, как правило, используется покрытие магнитных НЧ оболочкой, среди материалов которой особенно можно выделить полимеры, диоксид кремния, а также золото. Все перечисленные варианты позволяют также проводить многоэтапную модификацию НЧ за счет наличия на поверхности функциональных групп, доступных для химического связывания. НЧ Fe_3O_4 считаются нетоксичными вплоть до концентраций $100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, выше которых может наблюдаться окислительный стресс, нарушение работы митохондрий и другие эффекты. Кроме того, в случае создания многокомпонентных систем на основе НЧ Fe_3O_4 необходимо учитывать потенциальное токсическое влияние каждого материала по отдельности, так как НЧ подвергаются деградации *in vivo*.

1.4 Наночастицы магнетит-золото для биомедицинского применения

НЧ на основе магнетита и золота являются исключительными кандидатами для биомедицинских применений. Магнитные свойства Fe_3O_4 позволяют осуществлять магнитную манипуляцию и нацеливание, ГМЧ, а также контраст в T_2 -взвешенной МРТ (см. главу 1.2). Явление ППР, интенсивное рассеяние света, большой атомный номер и высокая электронная плотность НЧ Au, с другой стороны, делают их перспективными для таких методов диагностики, как оптическая визуализация и КТ, а также для фототермальной терапии (ФТТ) [7]. Кроме того, как золото, так и магнетит являются биосовместимыми и могут быть легко функционализированы благодаря сродству различных химических функциональных групп к поверхности НЧ, включая тиольные/дисульфидные связи для Au и катехины, силаны или диолы для Fe_3O_4 . Создание гибридных НЧ магнетит-золото со структурой «ядро-оболочка» или «гантель» позволяет объединить функциональные возможности отдельных материалов, а также приобрести новые. К таковым, в частности, относятся мультимодальная визуализация, мультимодальная гипертермия, определенные примеры в тераностике и адресной доставке лекарств, а также расширение потенциала магнито-механической манипуляции. Эти, а также некоторые другие применения будут рассмотрены ниже. Далее, с учетом требований к физическим и химическим свойствам магнитных биоматериалов, изложенных в главе 1.3, будут обозначены существующие проблемы, а также перспективные, но еще не изученные возможности гибридных НЧ магнетит-золото.

1.4.1 Применение наночастиц магнетит-золото в диагностике

Примечательно, что в относительно большом числе работ НЧ магнетит-золото рассматриваются только как контрастные агенты для МРТ. Так, в работе [59] с этой точки зрения сравнивались свойства НЧ Fe_3O_4 диаметром 14 нм и НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ с тем же размером магнитной составляющей. Однако невысокая намагниченность насыщения НЧ (не более $40 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$) привела к умеренной R_2 -релаксивности с максимальной величиной порядка $150 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ для НЧ Fe_3O_4 . Особенностью статьи [159] являлась одновременная функционализация НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ двумя различными типами лигандов. НЧ Au были ковалентно покрыты стабилизирующей оболочкой на основе тиол-содержащего ПЭГ-амина, а НЧ Fe_3O_4 – антителами к эпидермальному фактору роста (EGFR), присоединенными через ПЭГ-дофамин. За счет антител на поверхности НЧ, последние эффективно поглощались клетками эпидермоидной карциномы человека A431, обеспечивая контрастирование последних. Примечательно, что R_2 -релаксивность НЧ в культуре клеток ($80 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) была ниже, чем в коллоидном растворе ($105 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), что, вероятно, объясняется процессами агрегации и/или окисления. НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ с R_2 -релаксивностью на уровне коммерческих контрастных агентов ($120 - 150 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) в свою очередь, рассматривались для контрастирования печени здоровых крыс *in vivo* в работах [160,161], понижая интенсивность сигнала в 1,5 – 2 раза.

НЧ магнетит-золото находят широкое применение и в мультимодальной визуализации (см. пункт 1.2.4) за счет наличия в составе двух компонентов с различными свойствами. В частности, большое внимание уделяется использованию подобных НЧ как двойных контрастных агентов для МРТ и КТ, позволяющим получить анатомические изображения одновременно твердых и мягких тканей с высоким пространственным разрешением. Так, при введении НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в ушные вены кролика, авторам [10] удалось одновременно визуализировать правый желудочек сердца и печень методами КТ и МРТ, соответственно. Было также выявлено, что по своей эффективности для КТ-визуализации низкие концентрации НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ были сопоставимы с высокими концентрациями коммерческого агента на основе йода. В аналогичном исследовании НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ были использованы в качестве *in vivo* контрастных агентов на модели мыши для визуализации печени методом МРТ, а также печени и аорты методом КТ [162]. Исследование [11] отличается тем, что авторы сумели модифицировать НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ тремя типами лигандов: комплексом Eu^{3+} , связанным с НЧ Fe_3O_4 через ПЭГ-дофамин, а также ПЭГ-производными фолиевой кислоты и флуоресцентного красителя FITC, связанными с НЧ Au через тиольную группу. В совокупности это позволило

осуществлять селективную *in vitro* визуализацию клеток HeLa (экспрессирующих рецептор фолиевой кислоты) методами МРТ и ОВ, в качестве контроля использовались эмбриональные фибробласты здоровой мыши NIH-3T3.

В ряде работ рассматриваются свойства НЧ магнетит-золото одновременно для 3-4 методов визуализации. Так, в работе [163] авторы целенаправленно наращивали «золотую» часть НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (начальным размером 16-6 нм, соответственно) с получением анизотропных НЧ Au в форме звезд, что приводило к улучшенным характеристикам в МРТ, КТ и ФАВ, тестировавшимся на клетках карциномы легкого человека A549. Примечательно, что в этой же работе впервые был поднят вопрос о зависимости R_2 -релаксивности НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ от их размера и получены начальные данные, говорящие о росте R_2 с 285 до 381 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ при увеличении диаметра НЧ Fe_3O_4 с 16 до 20 нм. В работе [164] НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ были одновременно функционализированы хелатным комплексом Cu^{64} (на НЧ Au) и антителами к EGFR (на НЧ Fe_3O_4), что обеспечивало эффективное контрастирование подкожно привитой мыши опухоли A431 (экспрессирующей EGFR) методами МРТ, ПЭТ и ОВ.

1.4.2 Применение наночастиц магнетит-золото в гипертермии и доставке лекарств

Существует несколько примеров работ, исследующих свойства НЧ магнетит-золото только для ГМЧ. В статье [165] сравнивалась эффективность тепловыделения НЧ Fe_3O_4 диаметром 5,4 нм и НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ с тем же размером магнитного ядра и толщиной оболочки 0,5 нм. Было установлено, что покрытие НЧ золотой оболочкой приводило к увеличению SLP до 1,5 раз по сравнению с НЧ Fe_3O_4 (444 и 257 $\text{Вт}\cdot\text{г}^{-1}$, соответственно, в МП частотой 44 Гц и амплитудой 46,5 мТл). Кроме того, величина SLP варьировала в зависимости от растворителя; максимум SLP для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ составил 976 $\text{Вт}\cdot\text{г}^{-1}$ в этаноле при частоте поля 430 Гц. При этом НЧ были нетоксичны для клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и эмбриональных кардиомиоцитов крысы H9c2 (выживаемость более 80%). Вместе с тем, исследований, объясняющих уникальную величину SLP НЧ в этаноле, а также тестирование НЧ для ГМЧ *in vitro* не проводились.

Наиболее полным с фундаментальной точки зрения исследованием в этом направлении можно считать работу [12], авторы которой сравнивали SLP гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ с размером магнитной составляющей от 18 до 39 нм (кубической формы). Несмотря на то, что согласно результатам рентгенофазового анализа (РФА) и Мессбауэровской спектроскопии в составе магнитных НЧ была обнаружена

эквивалентная доля $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ и Fe_3O_4 , при 5 К были получены значения намагниченности насыщения M_s вплоть до $66 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$, а коэрцитивной силы H_c – вплоть до 55 мТл. В совокупности это привело к оптимальным значениям SLP ($1330 \pm 20 \text{ Вт}\cdot\text{г}^{-1}$) для НЧ магнетит-золото размером 23 нм в МП 300 кГц, 30 мТл. Однако приведенные в статье значения SLP являются сильно завышенными, что подтверждает приведенная в приложении кривая нагрева для концентрации Fe в диапазоне 6-12 мг·мл⁻¹, дающая $\Delta T/\Delta t = 0,640 \text{ K/c}$, что соответствует величине $\text{SLP} = 223 - 447 \text{ Вт/г}$. Можно сделать вывод, что предложенная в статье схема оптимизации физических свойств гибридных НЧ перспективна, однако требует дальнейшего изучения. Кроме того, авторы отмечали, что селективное травление НЧ Au при сохранении неизменного размера магнитных НЧ приводит к снижению величины SLP на 10-20%, которое объясняется фактом дополнительного рассеяния тепла золотыми НЧ.

Так называемая мультимодальная гипертермия при помощи НЧ магнетит-золото возможна при комбинации ГМЧ и ФТТ, в которой для нагрева НЧ используется источник лазерного излучения. НЧ, содержащие золото, поглощают фотоны света за счет явления плазмонного резонанса, преобразуя энергию в тепло. Их дополнительным преимуществом является поглощение излучения именно в ИК-диапазоне (600-1000 нм), которое беспрепятственно может проходить через живые ткани, не повреждая их. Так, в работе [50] рассматривалась мультимодальная гипертермия *in vitro* на клеточной культуре HeLa с использованием НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ размером магнитного ядра 18 нм и толщиной оболочки 2 нм, намагниченностью насыщения $60 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$. За счет комбинации МП частотой 560 кГц и амплитудой 6,2 мТл и лазера с длиной волны 350-800 нм и мощностью $30 \text{ мВт}\cdot\text{см}^2$, прикладываемых в течение 5-30 минут, достигался синергетический эффект, позволяющий добиться снижения выживаемости клеток до 0%.

Единственным примером использования мультимодальной гипертермии *in vivo* с участием магнитно-золотых НЧ является статья [9], авторы которой синтезировали многоядерные НЧ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3.\text{@Au}$ с диаметром магнитной составляющей около 30 нм и толщиной золотой оболочки от 4 до 20 нм. В экспериментах использовали МП частотой 110 кГц и амплитудой 25 мТл и ИК-лазер с длиной волны 680 нм и мощностью $300 \text{ мВт}\cdot\text{см}^2$. При тестировании НЧ на мышах с подкожно привитыми опухолями аденокарциномы предстательной железы человека PC-3 каждый метод по отдельности обеспечивал нагрев требуемой области на $9\text{-}10^\circ\text{C}$, в то время как их комбинация позволяла достичь повышения температуры на 20°C (от 28°C на поверхности кожи до 48°C) всего за 2 минуты. Нагрева контрольной опухоли, в которую НЧ не вводились, не наблюдалось. Примечательно, что спустя 3 дня после введения НЧ *in vivo* их

теплогенерирующая способность сохранялась на уровне 80% от исходной. Кроме того, в работе была в 10 раз снижена доза вводимых НЧ по сравнению с классической магнитной гипертермией.

В большинстве работ, рассматривающих НЧ магнетит-золото как платформу для доставки лекарств, с этой целью используются структуры типа $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, которые обладают «двойной» химией поверхности. На практике это означает возможность контролируемой функционализации двумя типами лигандов за счет их селективного связывания с поверхностью Fe_3O_4 и Au, соответственно. Так, в работе [8] находящиеся в составе гибридной структуры НЧ Fe_3O_4 были ковалентно связаны с производным антитела герцептина, содержащим также фрагмент дофамин-ПЭГ, а НЧ золота – с тиол-содержащим производным противоопухолевого препарата цисплатина. Далее авторы продемонстрировали адресную доставку НЧ в Her2-положительную культуру аденокарциномы молочной железы человека Sk-BR-3 (в качестве контроля брали Her2-отрицательную культуру MCF-7). При проникновении НЧ во внутриклеточное пространство происходило высвобождение цисплатина (несмотря на его ковалентную связь с поверхностью НЧ Au), что приводило к специфичной гибели клеток Sk-BR-3 ($\text{IC}_{50} = 1,76 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Pt}$) по сравнению с клетками MCF-7 ($\text{IC}_{50} = 3,5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Pt}$).

В статье [166] НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ предлагается использовать для комбинации генной терапии с химиотерапией в рамках стимул-чувствительной системы. В качестве доказательства этой концепции НЧ Fe_3O_4 в составе «гантелей» были ковалентно связаны с pH-чувствительным полимером PDMAEA (имеющим на конце пирокатехин), а НЧ Au – с термочувствительным полимером PNIPAAm-co-PEGA (с тиольной группой). Далее в полимерную оболочку PDMAEA загружали анти-GFP ми-РНК, а в оболочку PNIPAAm-co-PEGA – гидрофобный краситель нильский синий (Nile Blue). Понижение pH до 5 или повышение температуры до 43°C приводило к подавлению экспрессии GFP в модифицированных клетках рака шейки матки человека HeLa до 40% от исходного уровня или высвобождению загруженного красителя, соответственно.

1.4.3 Применение наночастиц магнетит-золото в магнито-механической манипуляции

Применение магнитных частиц, покрытых золотой оболочкой, для магнито-механического управления активностью клеток и биомолекул упоминается лишь в единичных работах. Так, авторы статьи [102] использовали для этой цели частицы пермаллоя FeNi в форме дисков (толщиной 60 нм, диаметром около 1 мкм), покрытые золотой оболочкой толщиной 5 нм. Дополнительно они были модифицированы

антителами IL13 α 2R, которые обеспечивали специфическое связывание частиц с клетками мультиформной глиобластомы N10. Воздействие низкочастотного переменного МП частотой 10-60 Гц и амплитудой 9 мТл за счет механического вращения дисков приводило к апоптозу клеток вплоть до 90% (при частоте 10-20 Гц), которое подтверждалось изменением их морфологии, а также LDH-тестом. При этом в случае модификации дисков неспецифическими антителами IgG максимальный эффект поля достигал лишь 20%.

Наиболее полно магнито-механическое воздействие НЧ магнетит-золото описывает работа [151], авторы которой использовали НЧ Fe₃O₄@Au диаметром 50 нм (размером магнитного ядра 8-12 нм), функционализированные тиол-содержащими ДНК-аптамерами AS-14. За счет данного покрытия достигалась активная доставка, а также взаимодействие с фибронектином асцитной карциномы Эрлиха, являющемся механочувствительной частью цитоскелета. Воздействие низкочастотного переменного МП частотой 50 Гц и амплитудой 10 мТл в течение 10 минут приводило к активации каспазы 3/7 и апоптозу опухоли как *in vitro*, так и *in vivo* (трехкратное внутривенное введение за 13 дней эксперимента) за счет осцилляции НЧ.

1.4.4 Применение наночастиц магнетит-золото в тераностике

С точки зрения тераностики, наиболее распространенным является использование НЧ магнетит-золото в комбинации МРТ и ФТТ, однако только в исследованиях *in vitro*. Так, в статье [53] НЧ Fe₃O₄-Au с диаметром НЧ Fe₃O₄ и Au 18 и 6 нм, соответственно, применялись для адресной ФТТ колоректального рака человека. При этом НЧ были функционализированы одноцепочечными антителами, которые связывались с антигенами A33, экспрессирующимися на поверхности клеток SW 1222 (в качестве контрольной культуры использовались клетки HT29). Было продемонстрировано, что НЧ захватывались специфичными к антителу клетками SW 1222 в пять раз быстрее по сравнению с культурой HT29. Это, в свою очередь, приводило к специфичной ФТТ – после 6 минут воздействия лазерного излучения с длиной волны 800 нм и мощностью 5,1 Вт·см² в культуре SW 1222, экспрессирующей антиген A33, наблюдалась смерть 53% клеток, в то время как в контроле (HT29) погибло менее 5% клеток. В качестве недостатков работы стоит отметить высокую мощность используемого лазерного излучения, а также то, что МРТ в работе использовалась только на уровне доказательной концепции (фантомные изображения), показавшей низкую R₂-релаксивность НЧ (не более 70 мМ⁻¹·с⁻¹). Схожей работой является [167], в которой НЧ γ -Fe₂O₃@Au, функционализированные антителами к EGFR, использовались для ФТТ клеток рака

молочной железы человека MDA-MB-468. В статье [168] НЧ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-@Au}$, функционализированные аптамерами MUC-1, вызывали гибель до 80% специфичных к ним клеток колоректального рака человека HT29 при облучении лазером с длиной волны 820 нм и мощностью $0,7 \text{ Вт}\cdot\text{см}^2$, в то время как выживаемость неспецифичные яйцеклетки китайского хомячка CHO достоверно не изменялась. Визуализация НЧ методом МРТ также была показана в работе только на уровне фантомных изображений.

Прочие комбинации методов терапии и диагностики с применением НЧ магнетит-золото встречаются в единичных работах. Так, в статье [169] НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ диаметром магнитного ядра 5 нм и толщиной оболочки 20-25 нм, функционализированные моноклональными антителами 7F5, предлагается использовать для МРТ-диагностики и иммунотерапии аденокарциномы предстательной железы человека. Авторы показали, что *in vitro* НЧ вызывают подавление роста клеток РС-3, экспрессирующих соответствующие антигены, причем терапевтическое действие модифицированных частиц не отличалось от действия свободных антител, а сами НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ не проявляли цитотоксического воздействия. На следующем этапе НЧ внутривенно вводили мышам с имплантированной подкожно опухолью РС-3, при этом в течение 24 ч наблюдалось значительное ослабление сигнала на T_2 -взвешенном МРТ-изображении. При трехкратном введении НЧ динамика роста опухоли замедлялась в три раза по сравнению с контрольной группой, получавшей плацебо.

В недавнем исследовании [170] представлены результаты использования НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ диаметром 13 нм, покрытых полисорбатом 20, в качестве контрастных и радиосенсибилизирующих агентов. В соответствии с намагниченностью насыщения $40 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$, НЧ обладали умеренной R_2 -релаксивностью в МРТ ($147 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$). Увеличение радиочувствительности при введении НЧ тестировали на клеточных линиях остеогенной саркомы человека MG63 и эмбриональных фибробластах здоровой мыши NIH-3T3. Лучевая терапия в дозе 10 Грей приводила к снижению выживаемости клеток MG63 до 10%, а клеток 3T3 – только до 25%, что подтверждает селективную радиосенсибилизацию в отношении остеогенной саркомы.

1.4.5 Проблемы и перспективы применения наночастиц магнетит-золото в биомедицине

1.4.5.1 Оптимизация физических свойств наночастиц

Из представленного в работе обзора литературы можно сделать вывод, что синтезу НЧ магнетит-золото посвящено колоссальное число работ; это относится как к НЧ

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ со структурой «ядро-оболочка», так и к НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ со структурой «гантель». Таким образом, имеющийся набор методов позволяет успешно получать гибридные НЧ с различной структурой в общем и размером магнитной составляющей в частности.

Тем не менее, в литературе отсутствуют систематические сведения о том, какой тип структуры более выгоден для тех или иных применений, а также какой размер магнитной составляющей в НЧ магнетит-золото приводит к наилучшим характеристикам в МРТ, ГМЧ и их комбинации. Размер НЧ Fe_3O_4 в составе гибридной структуры в большинстве работ не превышает 15 нм, при этом они имеют сферическую форму [8,140,170], намагниченность насыщения M_s – не более $40\text{-}60 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ [159,167,170]; кроме того, утверждается, что при комнатной температуре НЧ магнетит-золото находятся в суперпарамагнитном состоянии с нулевой коэрцитивной силой H_c и низкой константой анизотропии [54,140]. Вероятно, одной из причин подобных магнитных характеристик является частичное окисление Fe_3O_4 до $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, однако детальное исследование степени окисления железа (например, методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и/или Мессбауэровской спектроскопии) приводится не во всех работах.

Вместе с тем, повышение M_s до значений, близких к объемному материалу, за счет улучшения качества кристаллической структуры и получения стехиометричного Fe_3O_4 (см. пункт 1.1.1), умеренный рост H_c , повышение эффективной анизотропии НЧ за счет перехода от сферической к ограненной форме способны существенно повысить значения R_2 -релаксивности и SLP. Впервые предположение об этом было сделано в статье [54]. Авторы обнаружили, что по сравнению с НЧ Fe_3O_4 , НЧ магнетит-золото при идентичном размере магнитной составляющей (7-8 нм) обладают повышенной T_B (150-200 по сравнению с 80 К), практически в два раза большей H_c , в 1,5 раз большей K_{eff} , а также выходят на магнитное насыщение в большем поле. Достоверной разницы между структурам $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ обнаружено не было. Однако R_2 -релаксивность рассматриваемых НЧ не превышала $40\text{-}60 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ вследствие малых размеров последних (исследовались коллоидные растворы НЧ в гексане), а SLP НЧ не изучалась. Кроме того, из литературы известно, что свойства НЧ Fe_3O_4 (в частности, динамика спинов и появление спин-поляризационного перехода [171,172]) могут варьироваться при росте последних на зародышах благородных металлов, в частности, золота и серебра (по сравнению с отдельными НЧ Fe_3O_4). Таким образом, включение НЧ Fe_3O_4 в состав гибридной структуры с НЧ Au способно изменять магнитные свойства первых, что потенциально может улучшить производительность НЧ в МРТ и ГМЧ.

При рассмотрении ППР НЧ магнетит-золото в литературе встречаются различные мнения. Коллоидный раствор НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ обладает интенсивным пиком поглощения в

видимой области спектра, однако вопрос о том, как именно на положение пика ППР влияет толщина золотой оболочки, в статьях обсуждается различным образом. В частности, в работе [45] приводятся данные о синем сдвиге (от ≈ 600 нм при первоначальном добавлении ионов Au^{3+} до 525-530 нм) полосы поглощения при увеличении толщины золотой оболочки. Первоначальный красный сдвиг по сравнению с 520 нм авторы объясняли электромагнитным связыванием осцилляций плазмонов на внешней и внутренней поверхности тонкой золотой оболочки; при дальнейшем прибавлении Au^{3+} толщина оболочки увеличивается, и связывание становится все менее эффективным, вызывая синий сдвиг. В статье [173] приводится теоретический расчет для НЧ с диаметром магнитного ядра 18 нм, согласно которому при толщине золотой оболочки более 15 нм спектр НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ идентичен спектру НЧ Au того же размера. С другой стороны, в работе [174] наблюдается прямо противоположное явление - красный сдвиг от 525 до 600 нм при увеличении толщины золота. Авторы связывали это с плазмонной гибридизацией при росте оболочки, а также с усилением взаимодействия поверхностных плазмонов соседних НЧ между собой. Возможным объяснением описанных выше результатов является различная морфология НЧ: так, в [45] при последовательном добавлении и восстановителя НЧ становились все более сферическими, тогда как в [174] – напротив, поверхность становилась неровной. При рассмотрении НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, с одной стороны, положение пика ППР теоретически определяется только размером НЧ Au и, как правило, находится в диапазоне 540 – 600 нм [7], в отдельных исследованиях сообщается о сдвиге ППР в ИК-область до 700-800 нм [163]. Однако при определенном соотношении Fe/Au в структуре типа «гантель» оказывается, что вследствие анизотропного контакта НЧ Au с магнитным материалом и малого размера НЧ Au по сравнению с НЧ Fe_3O_4 пик ППР в спектре не выражен (или наблюдается «плечо»). Так, например, авторы работы [37] обнаружили отсутствие пика ППР для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, полученных из пентакарбонила железа $\text{Fe}(\text{CO})_5$, аналогичный результат наблюдался также в статье [163]. Таким образом, применимость гибридного материала в ФТТ в каждом случае необходимо оценивать отдельно, в зависимости от структуры и морфологии НЧ.

1.4.5.2 Оптимизация физико-химических и биологических свойств наночастиц

Для стабилизации НЧ магнетит-золото, поддержания их оптимального гидродинамического размера в воде, буферных растворах и биологических средах (см. пункты 1.3.3.1, 1.3.3.2) предпочтительно покрытие полимерной оболочкой. Аналогично НЧ магнетита, для этого могут быть использованы производные ПЭГ, полимеры из ряда

Pluronic, ДСПЭ-ПЭГ и др. [38] Что касается физико-химической характеристики НЧ магнетит-золото, во многих работах приводятся минимальные данные (неполные сведения о магнитном поведении НЧ, отсутствуют данные о стабильности НЧ в различных средах, под действием МП) [9,50,175]. Вместе с тем, на взгляд автора, именно четкая взаимосвязь «состав-структура-свойства» является критичным моментом подобных исследований. В отсутствие достаточных сведений о характеристиках самой системы НЧ даже впечатляющие данные о ее последующем биомедицинском применении [9,151] не могут быть подкреплены достоверными гипотезами и объяснены с фундаментальной точки зрения.

Стоит отметить, что на этапе *in vitro* и *ex vivo* исследований НЧ актуальным представляется не только изучение токсичности НЧ стандартными методами (MTS-, LDH-, АФК-тест и т.д.), но и изучение возможного иммунного ответа на введение НЧ, в том числе, активации макрофагов и теста на гемолиз. Данные этапы характеристики НЧ магнетит-золото также крайне редко встречаются в литературе. Большое число биомедицинских исследований на основе НЧ магнетит-золото останавливаются на этапе *in vitro* [8,53,140,167]; некоторые работы по мультимодальной гипертермии, напротив, демонстрируют успешное применение *in vivo*, пропуская предварительный этап тестирования на клеточных культурах [9]. Также существуют примеры, когда исследования по мультимодальной визуализации *in vitro* проводятся на одной клеточной культуре, а *in vivo* изучаются другие органы/ткани. Так, в работе [10] НЧ Fe₃O₄-Au исследуются для визуализации печени и сердца мыши *in vivo*, а отсутствие токсичности НЧ доказывается на клеточной культуре HeLa.

Существенное накопление НЧ в целевой области, безусловно, имеет первостепенную важность как для ее диагностики, так и для терапии (если речь идет об опухолевых моделях, критичным моментом является также внутривенное введение, часто заменяемое на внутриопухолевое [9,175]). В то же время, в ряде работ количественные данные о концентрации НЧ магнетит-золото в целевых тканях не приводятся [151,169]. Обращает на себя внимание практически полное отсутствие *in vivo* исследований НЧ магнетит-золото, посвященных мультимодальной визуализации (например, МРТ/ КТ) опухолевых моделей (упоминается визуализация органов здоровых животных, в частности, печени и сердца). Это может быть связано, во-первых, с недостаточно высокой R₂-релаксивностью НЧ (не более 150 мМ⁻¹·с⁻¹); во-вторых, с потенциально низким накоплением в опухоли при внутривенном введении. Так, в работе [10] упоминается, что НЧ были стабилизированы ТМАОН – вероятно, это не обеспечивало достаточного времени циркуляции в крови (токсичность, отсутствие полимерной оболочки).

1.4.5.3 Перспективное применение наночастиц магнетит-золото

Для дальнейшего развития магнито-механического направления с использованием НЧ магнетит-золото, перспективной представляется дистанционная регуляция активности ферментов, принцип осуществления которой при участии НЧ магнетита был описан в пункте 1.2.5. Наличие золотой оболочки способно решить проблему ковалентной связи фермента с поверхностью НЧ, расширить спектр доступных для связи с ферментом лигандов (возможно использование любых с тиольной или дисульфидной группой), а также изучить эффективность механического воздействия поля в зависимости от длины углеводородной цепи лиганда. В случае успешного варьирования размера магнитного ядра (не достигающего при этом микронных размеров, как в работе [102]) в описанной системе возможно также расширить диапазон сил, передаваемых на молекулы фермента, за счет увеличения намагниченности НЧ в МП. В настоящее время в литературе подобные работы не проводились.

С точки зрения современной концепции тераностики (см. пункт 1.2.4) именно НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ являются идеальным прототипом системы «все-в-одном», способной диагностировать заболевания, доставлять лекарственное средство и визуализировать его высвобождение. Выше были описаны существующие примеры так называемой «двойной» функционализации НЧ для доставки лекарств (лекарство + вектор [8], либо ми-РНК + флуоресцентная модель лекарства [166]) и мультимодальной визуализации (флуоресцентные метки + вектор [11], либо стабилизирующая оболочка + вектор [159]). Тераностика же может быть реализована при помощи «двойной» функционализации НЧ ковалентно связанной с поверхностью Au меткой, позволяющей визуализировать сами НЧ-носители, а также нековалентной загрузки лекарства или его флуоресцентной модели в полимерную оболочку на НЧ Fe_3O_4 , позволяющей судить об эффективности высвобождения препарата в опухоли. За мультимодальную диагностику (методом МРТ и флуоресцентной/оптической визуализации, рассматриваемой ранее в литературе для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ только в работе [11] и только *in vitro*) в такой системе также «отвечают» НЧ магнетита, связанные с меткой. К настоящему времени подобные эксперименты еще не проводились, и НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ не рассматривались для тераностики *in vivo* в принципе.

Кроме того, следующим этапом после доказательства концепции биомедицинского применения гибридных НЧ магнетит-золото, уже широко представленной в литературе, является переход к так называемой платформенной технологии, функциональной как *in vitro*, так и *in vivo*. Вследствие очевидной сложности гибридных систем чрезвычайно важно показать весь «путь» НЧ от синтеза с последующей полной характеристикой

физико-химических свойств, модификацией функциональными молекулами, биологическим тестированием до конечного *in vivo* применения. Насколько известно автору, в данный момент подобные комплексные работы по описываемой теме в литературе отсутствуют.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы

Четырехводный хлорид железа (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), безводный хлорид железа (III) (FeCl_3), пентакарбонил железа (0) ($\text{Fe}(\text{CO})_5$), ацетилацетонат железа (III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), семиводный сульфат железа (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), нитрат калия (KNO_3), тригидрат золотохлористоводородной кислоты ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), дифениловый эфир, дибензиловый эфир, 1-октадецен, 1,2-гексадекандиол, олеиновая кислота, олеиламин, полиэтиленимин (25000 г/моль, разветвленный) дигидрат цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), гидрохлорид гидроксилamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), гидроксид тетраметиламмония (ТМАОН), гидроксид аммония (NH_4OH), гидроксид натрия (NaOH), раствор хлорной кислоты (HClO_4), L-цистеин, липоевая кислота, 3-меркаптопропионовая кислота, 11-меркаптоундекановая кислота, тиол-ПЭГ-кислота (5000 г/моль, $n \approx 113$), N-гидроксисульфосукцинимид натрия соль (S-NHS), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорид (EDC), альфа-химотрипсин (EC 3.4.21.1, Bovine Pancreas), p-нитроанилид N-бензоил-L-тирозина (BTNA), p-нитроанилид N-сукцинил-L-аланил-L-аланил-пролил-L-фенилаланина (SAAPFNA), трис (гидроксиметил)аминометан (TRIS), цистамин дигидрохлорид, доксорубицин (DOX) гидрохлорид, нильский красный (NRed), таблетки для приготовления 0,02М натрий-фосфатного буферного раствора (1xPBS) pH 7,4 фирмы Sigma-Aldrich; 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N- [карбокси (полиэтиленгликоль) -5000] аммониевая соль (DSPE-ПЭГ-COOH) фирмы Avanti Polar Lipids; сульфацианин 5 NHS-эфир (Cy5) фирмы Lumiprobe, диализные пакеты SERVAPOR MWCO 12-14 кДа компании Spectrum Laboratories, Inc; концентрированная азотная кислота (HNO_3), концентрированная соляная кислота (HCl), изопропанол, бутанол-1, гексан, хлороформ, ацетон, диоксан, ацетонитрил (все ч.д.а.) компании Реахим. Для приготовления всех растворов в процессах синтеза и анализа использовалась деионизованная дистиллированная (DI) вода, приготовленная в системе Milli-Q-RO4 (Millipore).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Синтез и функционализация наночастиц

Синтез $\text{HCl Fe}_3\text{O}_4$. Образец 1 [23,176]: 650 мг FeCl_3 и 398 мг $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяли в 5 мл 2М HCl , полученный раствор прикапывали к 50 мл 0,7М NH_4OH в плоскодонной

колбе объемом 50 мл, смесь перемешивали в течение 30 мин. НЧ декантировали при помощи магнита, промывали 50 мл 2М HClO_4 , затем вновь подвергали магнитной декантации и диспергировали НЧ в 50 мл DI H_2O при помощи ультразвуковой (УЗ) бани (30 мин).

Образец 2 [177]: В трехгорлой колбе объемом 250 мл, снабженной термометром и обратным холодильником, смешивали 200 мл 1-октадецена и 28,8 мл олеиновой кислоты, полученный раствор нагревали до 110°C в атмосфере аргона при перемешивании, после чего выдерживали при данной температуре в течение 1 ч. Далее в раствор вводили 4,0 мл $\text{Fe}(\text{CO})_5$ при помощи шприца, смесь нагревали со скоростью $3,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ до температуры кипения ($\approx 310^\circ\text{C}$) и выдерживали в течение 2 ч. Далее раствор охлаждали до комнатной температуры, переливали в стакан на 1 л, добавляли 600 мл бутанола-1 и производили отделение НЧ от раствора при помощи магнитной декантации. На заключительном этапе НЧ отмывали от поверхностно-активных веществ при помощи центрифугирования в течение 10 мин (6000 об./мин) с добавлением изопропанола, после чего диспергировали в 250 мл 0,1 М ТМАОН при помощи УЗ бани (30 мин).

Образец 3 [178]: В трехгорлой колбе объемом 500 мл, снабженной термометром и обратным холодильником, смешивали 80 мл дибензилового эфира, 2,7 мл олеиламина и 20,2 мл олеиновой кислоты, 1,4 г ацетилацетоната железа и 8,26 г 1,2-гексадекандиола, полученную смесь нагревали до 110°C в атмосфере аргона при перемешивании, после чего выдерживали при данной температуре в течение 1 ч. Затем систему нагревали до 200°C и выдерживали 30 мин, после чего нагревали до температуры кипения ($\approx 290^\circ\text{C}$) со скоростью $4^\circ/\text{мин}$ и выдерживали в течение 1 ч. Далее раствор охлаждали до комнатной температуры, переливали в стакан на 1 л, добавляли 600 мл бутанола-1 и производили отделение НЧ от раствора при помощи магнитной декантации. На заключительном этапе НЧ отмывали от поверхностно-активных веществ при помощи центрифугирования в течение 10 мин (6000 об./мин) с добавлением изопропанола, после чего диспергировали в 250 мл 0,1 М ТМАОН при помощи УЗ бани (30 мин).

Образец 4 [174]: В трехгорлой колбе объемом 250 мл, снабженной термометром и обратным холодильником, растворяли 0,7 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 80 мл DI H_2O в атмосфере аргона при механическом перемешивании, после чего добавляли 10 мл 2,0 М раствора KNO_3 , 10 мл 1,0 М раствора NaOH и ПЭИ до конечной концентрации 2 г/л. Смесь нагревали до 90°C со скоростью $3^\circ/\text{мин}$ и выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Далее раствор охлаждали до комнатной температуры, НЧ декантировали при помощи магнита, промывали 50 мл 2М HClO_4 затем вновь подвергали магнитной декантации и диспергировали НЧ в 50 мл DI H_2O при помощи УЗ бани (30 мин).

Синтез НЧ Fe₃O₄@Au методом восстановления H₂AuCl₄ при помощи Na₃C₆H₅O₇ (Образцы 1А, 2А, 3А, 4А) [47]. В двугорлой колбе объемом 250 мл, снабженной термометром и обратным холодильником, при перемешивании растворяли 35 мг H₂AuCl₄·3H₂O в 120 мл DI H₂O, доводили раствор до кипения, затем прибавляли 5 мл раствора НЧ Fe₃O₄ (2·10⁻⁴ моль). После повторного закипания добавляли 5 мл 0,08 М раствора Na₃C₆H₅O₇. Затем раствор кипятили ещё 5 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры. НЧ выделяли при помощи центрифугирования в течение 5 мин (7000 об./мин, RCF 3300g) и диспергировали в DI H₂O.

Синтез НЧ Fe₃O₄@Au методом восстановления H₂AuCl₄ при помощи NH₂OH·HCl (Образец 1Б) [45]. В плоскодонную колбу объемом 250 мл при перемешивании вносили 0,188 мл НЧ Fe₃O₄ (7,5·10⁻⁶ моль) и 7,312 мл DI H₂O, прибавляли 7,5 мл 0,1 М раствора Na₃C₆H₅O₇ и перемешивали в течение 10 мин, после чего добавляли 135 мл DI H₂O. Далее в раствор вносили аликвоты 1% (по массе) раствора H₂AuCl₄ и 0,2М раствора NH₂OH[□]HCl по схеме в таблице 1, соблюдая интервал в 15 мин между добавлениями. НЧ выделяли при помощи центрифугирования в течение 5 мин (7000 об./мин, RCF 3300g) и диспергировали в DI H₂O.

Таблица 1. Количества реагентов, использованные в ходе синтеза НЧ Fe₃O₄@Au

Итерация	Объем 1% раствора H ₂ AuCl ₄ , мл	Объем 0,2М раствора NH ₂ OH [□] HCl, мл
1	0,625	0,750
2	0,500	0,281
3	0,500	0,188
4	0,500	0,188
5	0,500	0,281

Синтез НЧ Au [179]. 35 мг H₂AuCl₄·3H₂O растворяли в 80 мл DI H₂O в двугорлой колбе объемом 250 мл, снабженной термометром и обратным холодильником, нагревали до 80°C, затем добавляли 200 мкл олеиламина и поддерживали температуру в течение 3 ч. Далее раствор охлаждали до комнатной температуры, переносили в одnogорлую колбу на 250 мл и упаривали воду при помощи роторного испарителя. На заключительном этапе НЧ Au диспергировали в 2 мл гексана.

Синтез НЧ Fe₃O₄-Au. Образцы 5 и 6 получали путем совместного термического разложения Fe(CO)₅ и H₂AuCl₄ (с *in situ* образующимися НЧ Au) по методике, взятой из [56] с некоторыми изменениями. В трехгорлой колбе объемом 250 мл, снабженной термометром и обратным холодильником, нагревали смесь 20 мл высококипящего

растворителя (дифениловый эфир в случае образца 5) или 1-октадецена (в случае образца 6), 2,584 г 1,2-гексадекандиола, 2 мл олеиламина и 2 мл олеиновой кислоты до 120 °С в атмосфере аргона и выдерживали при этой температуре в течение 30 мин. Далее в раствор вводили 0,28 мл $\text{Fe}(\text{CO})_5$ при помощи шприца, спустя 3 мин добавляли раствор $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (45 мг) в 5 мл растворителя и 0,5 мл олеиламина, после чего смесь нагревали со скоростью 3 °С/мин до температуры кипения (260°С для образца 5 и 310°С для образца 6) и выдерживали в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь окисляли на воздухе при перемешивании в течение 1 ч. Полученные НЧ отделяли при помощи центрифугирования течение 10 мин (6000 об./мин) с добавлением изопропанола и диспергировали в 20 мл гексана.

Образцы 7 и 8 получали путем термического разложения $\text{Fe}(\text{CO})_5$ в присутствии предварительно синтезированных зародышей Au (см. выше) по модифицированному протоколу из [180]. В трехгорлой колбе объемом 250 мл, снабженной термометром и обратным холодильником, нагревали смесь 20 мл высококипящего растворителя (дифениловый эфир в случае образца 7) или дибензилового эфира (в случае образца 8) и 1 мл олеиновой кислоты до 120 °С в атмосфере аргона и выдерживали при этой температуре в течение 30 мин. Далее в раствор вводили 0,28 мл $\text{Fe}(\text{CO})_5$ при помощи шприца, спустя 5 мин добавляли 2 мл раствора НЧ Au в гексана и 0,5 мл олеиламина, после чего смесь нагревали со скоростью 3 °С/мин до температуры кипения (260°С для образца 7 и $\approx 290^\circ\text{C}$ для образца 8) и выдерживали в течение 3 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь окисляли на воздухе при перемешивании в течение 1 ч. Полученные НЧ отделяли при помощи центрифугирования течение 10 мин (6000 об./мин) с добавлением изопропанола и диспергировали в 20 мл гексана.

Функционализация НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ тиол-содержащими лигандами. Покрытие НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ L-цистеином, 3-меркаптопропионовой кислотой, липоевой кислотой, 11-меркаптоундекановой кислотой, тиол-ПЭГ-кислотой (образцы М-1, М-2, М-3, М-4, М-5 и М-6) проводилось путем перемешивания 12 мл коллоидного раствора НЧ (10^{12} НЧ·мл⁻¹) и 12 мл раствора лиганда ($7,14 \times 10^{-8}$ М) в DI H₂O на магнитной мешалке в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего избыток лиганда удаляли при помощи диализа в течение 3 суток.

Модификация НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ α -химотрипсином (образцы серии ЕМ). К 0,75 мл раствора НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, функционализированных тиол-содержащими лигандами, добавляли 0,7 мг EDC и 0,2 мг S-NHS и выдерживали на шейкере при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее НЧ с активированными карбоксильными группами осаждали при помощи центрифугирования в течение 5 мин (7000 об./мин, RCF 3300g) и диспергировали

в 1 мл 20 mM цитратного буфера (pH 5,4). После этого к НЧ добавляли требуемое количество α -химотрипсина так, чтобы его конечная концентрация в растворе составляла 25-600 $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$, и выдерживали смесь в течение 2 ч на шейкере при комнатной температуре. Последней стадией являлась очистка от избытка несвязавшегося белка центрифугированием в течение 10 минут (7000 об./мин, RCF 3300g), после чего НЧ диспергировали в 1 мл 20 mM цитратного буфера (pH 5,4) и хранили в холодильнике.

Синтез НЧ-PEG. НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (образец 7) переводили в водную среду при помощи полимера DSPE-ПЭГ-COOH [181]. Для этого равные объемы НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ и полимера (оба 1 $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ в хлороформе) смешивали в вiale на УЗ бане в течение 5 мин и полученную смесь оставляли в слабом потоке аргона в течение ночи. После испарения растворителя к осадку НЧ добавляли 1 мл DI H_2O и затем ресуспендировали с помощью УЗ бани в течение 5-10 мин, избыток полимера удаляли двукратным центрифугированием в течение 5 минут (RCF 14100g). На заключительном этапе НЧ диспергировали в 1 мл DI H_2O и пропускали через шприцевый фильтр с диаметром пор 0,45 $\mu\text{м}$. Для контрольных экспериментов, подтверждающих селективную функционализацию красителей на поверхности магнетита/золота в составе НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ аналогичным образом переводили в водную фазу образец 4 (НЧ Fe_3O_4 на стадии их нахождения в органическом растворителе) либо НЧ Au, использовавшиеся в качестве зародышей для синтеза гантелевидных НЧ.

Синтез НЧ-Cy5. НЧ, ковалентно связанные с красителем, были получены путем конъюгации НЧ-PEG с тиол-содержащим производным Cy5. Для этого 0,1 мг Cy5 в 100 $\mu\text{л}$ DI H_2O добавляли к 5 мг дигидрохлорида цистамина в 900 $\mu\text{л}$ 1xPBS в пробирке Eppendorf (pH 8,3-8,5), встряхивали на вортексе и инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 4 ч. Полученное тиол-содержащее производное Cy5 перемешивали с 1 мл раствора НЧ-PEG на шейкере в течение ночи при комнатной температуре. Избыток красителя удаляли многократным центрифугированием, после чего проводили диализа полученного раствора НЧ-Cy5 в течение суток. Для подтверждения полного удаления несвязанного красителя аликвоту НЧ пропускали через центрифужные фильтры Amicon Ultra-4 (100 кДа).

Синтез NRed-НЧ-Cy5. NRed-НЧ-Cy5 синтезировали путем конъюгации НЧ-PEG с двумя флуоресцентными красителями, NRed и Cy5. Для этого 100 $\mu\text{л}$ NRed (1 $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ в хлороформе) добавляли к смеси 1 мл НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ и 1 мл раствора DSPE-ПЭГ-COOH в (оба 1 $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ в хлороформе), аналогично синтезу НЧ-ПЭГ, что привело к получению НЧ-NRed, стабильных в водном растворе (0,5 $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$). Параллельно с этим 0,1 мг Cy5 в 100 $\mu\text{л}$ DI H_2O добавляли к 5 мг дигидрохлорида цистамина в 900 $\mu\text{л}$ 1xPBS в пробирке Eppendorf (pH 8,3-8,5), встряхивали на вортексе и инкубировали на шейкере при

комнатной температуре в течение 4 ч. Полученное тиол-содержащее производное Cy5 перемешивали с 1 мл раствора НЧ-NRed на шейкере в течение ночи при комнатной температуре. Очистка NRed-НЧ-Cy5 от избытка красителей проводилась по протоколу для НЧ-Cy5.

Синтез DOX-НЧ-Cy5. DOX-НЧ-Cy5 были получены путем загрузки DOX в НЧ-Cy5. 100 мкл раствора DOX·HCl ($5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ в DI H₂O) добавляли к 1 мл НЧ-Cy5 ($1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ в 1xPBS), полученный раствор перемешивали на шейкере в течение ночи. Избыток DOX удаляли центрифугированием в течение 5 мин (7000 об./мин, RCF 3300g), после чего НЧ ресуспендировали на вортексе в DI H₂O.

2.2.2 Характеризация физических и химических свойств наночастиц

Кристаллическая структура образцов изучалась методом рентгенофазового анализа (РФА). Рентгеновские спектры измерялись от $2\theta = 30^\circ$ до 120° со скоростью сканирования $0,1^\circ$ на шаг и 3 с на точку с использованием рентгеновского порошкового дифрактометра Rigaku Ultima IV с Co-K α -излучением и графитовым монохроматором на дифрагированном пучке. Количественный РФА (включая оценку размера кристаллитов путем определения области когерентного рассеяния, ОКР) проводили с использованием программ PHAN% и SPECTRUM, разработанных на кафедре физического материаловедения НИТУ «МИСиС» (модификация метода Ритвельда) на основе минимизации разницы между поточечным экспериментальным спектром и модельным (рассчитанным) спектром. Для подгонки спектров оптимизировались параметры решетки и количество каждой фазы, а также размер кристаллитов.

Размер, морфологию и структуру НЧ в составе образцов изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Эксперименты проводились с использованием микроскопов JEOL JEM 1400 и JEOL JEM 2200FS с Cs-коррекцией при ускоряющем напряжении 200 кВ. Обзорные снимки были сделаны в режиме светлого поля. Для получения изображений в высоком разрешении использовался как режим светлого, так и темного поля с высокоугловым кольцевым детектором (HAADF-STEM). Образцы готовили путем нанесения и испарения капли суспензии НЧ в воде или изопропанолe на медную сетку с полимерным или углеродным покрытием (300 mesh). Средний диаметр НЧ рассчитывали на основе ПЭМ-изображений путем анализа около 1000 НЧ для каждого образца с использованием программного обеспечения ImageJ. Энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (EDX) и рентгеноспектральный микроанализ (РСМА) проводили с использованием детектора Oxford X-max.

Статические магнитные свойства образцов (петли гистерезиса, температурная зависимость намагниченности) изучали на вибромагнетометре в системе Quantum Design PPMS DynaCool в синтетических капсулах, содержащих порошок НЧ либо их раствор ($1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ в DI H_2O /1xPBS). Мессбауэровские спектры ядер ^{57}Fe регистрировали при комнатной температуре на спектрометре MS-1104Em в геометрии пропускания с источником излучения ^{57}Co (Rh). Спектральный анализ выполнялся в программе Univem MS: при этом определялись относительные интенсивности элементарных спектров.

Элементный состав образцов (железо, золото) определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с микроволновой плазмой на приборе Agilent 4200 MP-AES. Для измерения готовили серии из 5 калибровочных стандартов в диапазоне концентраций $0,1 - 1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (Au) и $0,5 - 2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (Fe) путем разбавления коммерческих стандартных растворов DI H_2O . Определяемые образцы растворяли в смеси $\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3 : 1$ (царской водке), разбавленной при помощи DI H_2O .

Характеризация коллоидных растворов НЧ. Гидродинамический размер и ζ -потенциал НЧ определяли методом динамического рассеяния света (DLS) на инструменте Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), а также анализа траектории НЧ (NTA) на приборе NanoSight NS500. Средние размеры НЧ и стандартные отклонения были получены из трех измерений для каждого образца. Запись оптических спектров НЧ в видимом диапазоне (400-800 нм) проводилась с использованием прибора Thermo Scientific Multiscan GO. Спектры флуоресценции регистрировали на приборе SpectraMax M5.

Определение количества фермента и его первичных аминогрупп на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$. Общее количество α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, определяли с использованием Micro BCA Protein Assay Kit. 150 мкл реагентов добавляли к 150 мкл образцов (серии EM), разбавленных до концентрации $\approx 10^{11} \text{ НЧ} \cdot \text{мл}^{-1}$ в микропланшете. Смесь интенсивно перемешивали в шейкере в течение 1 мин и затем инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После этого микропланшет охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность раствора при 562 нм. Количество иммобилизованного фермента определяли по линейному калибровочному графику для свободного α -химотрипсина в диапазоне $2-40 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$. В качестве фона использовали коллоидный раствор НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ($10^{11} \text{ НЧ} \cdot \text{мл}^{-1}$) без добавления реагентов. Определение количества первичных аминогрупп α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, проводили по стандартному протоколу с использованием реагента Fluram, описанному в [182]. В его основе лежит измерение флуоресценции реагента, связывающегося с первичными аминогруппами, при длине волны возбуждения (λ_{ex}) = 475 нм и эмиссии (λ_{em}) = 490 нм. Количество первичных аминогрупп иммобилизованного α -химотрипсина

рассчитывали по линейному калибровочному графику для свободного α -химотрипсина. В качестве фона использовали коллоидный раствор НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ без добавления реагентов.

Определение активности иммобилизованного α -химотрипсина. Активность α -химотрипсина определяли с помощью спектрофотометрии в видимом диапазоне путем измерения скорости ферментативного гидролиза субстратов (BTNA или SAAPFNA). Временная зависимость образования продукта (p-нитроанилина) регистрировалась на длине волны 405 нм. Для измерений использовался прибор ASTRA-M-SP (ООО «Нанодиагностика», Россия), включающий источник переменного тока (California Instruments 2001RP), спектрофотометр Avantes AvaSpec-2048, электромагнит и охлаждающий водный контур. Данная система позволяет проводить спектрофотометрические измерения в МП с регулируемой амплитудой ($B = 5 - 250$ мТл) и частотой ($f = 16 - 500$ Гц) *in situ*.

а) Активность в отсутствие МП. Для определения каталитической активности иммобилизованного α -химотрипсина в отсутствие МП, 1 мл 0,1 М буфера TRIS-HCl (pH = 8,2) в пластиковой кювете смешивали с 2-10 мкл коллоидного раствора НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, модифицированных α -химотрипсином и 2-3 мкл раствора субстрата (BTNA/ SAAPFNA) в смеси диоксан: ацетонитрил ($c = 1,5$ мг·мл⁻¹). После тщательного смешивания кювету помещали в блок спектрофотометра, совмещенного с индуктором МП, и регистрировали временную зависимость поглощения на длине волны 405 нм в течение 60 – 180 с.

б) Активность во время воздействия МП. Чтобы оценить влияние МП на каталитическую активность α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, был проведен следующий эксперимент. Реакционную смесь, идентичную той, которая использовалась для определения активности фермента в отсутствие МП, помещалась в спектрофотометр, совмещенный с индуктором МП. Через 60 – 90 с после начала реакции включали МП ($B = 88$ мТ, $f = 16 - 410$ Гц) и регистрировали временную зависимость поглощения на длине волны 405 нм в течение 60 – 180 с. В некоторых случаях активность α -химотрипсина также оценивали после действия МП. Для этого реакционную смесь изначально готовили в удвоенном объеме, после чего делили поровну между двумя одинаковыми кюветами. Одна из них являлась контрольной, она изначально ставилась в спектрофотометр. В это время другая кювета ставилась в МП. После 5,5-минутной выдержки в поле (2 экспозиции по 2,5 мин в поле + 0,5 мин паузы) эта кювета ставилась в спектрофотометр, а контрольная кювета 5,5 мин термостатировалась без МП. Процесс повторялся несколько раз. Влияние МП оценивалось как отношение активности в кювете, подвергаемой действию поля, к активности в контрольной кювете.

Определение количества красителей/ лекарства на НЧ Fe₃O₄-Au и кинетики высвобождения лекарства проводили методом спектрофотометрии. Во всех случаях использовался линейный калибровочный график, построенных для свободных красителей (Cy5, NRed) или лекарства (DOX) известной концентрации. В случае Cy5 поглощение регистрировали на длине волны 640 нм, NRed – 539 нм, DOX – 480 нм. В качестве фона использовали растворы НЧ-PEG без добавления красителей. Для изучения кинетики высвобождения DOX из DOX-НЧ-Cy5, 2,5 мл НЧ суспендировали в среде RPMI (pH = 7,2) или 0,1 М ацетатном буфере (pH = 4,7) до конечной концентрации 1000 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 154 мкг·мл⁻¹ Au, 33 мкг·мл⁻¹ Cy5, 285 мкг·мл⁻¹ DOX и инкубировали при 37 °С. Спустя 30 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч или 48 ч после начала инкубации, 500 мкл раствора центрифугировали (10 мин, RCF 14100 G) для полного осаждения DOX-НЧ-Cy5 и дополняли магнитной декантацией в течение 3-5 мин. Затем измеряли поглощение супернатанта на длине волны 480 нм, соответствующее высвободившемуся DOX. В качестве отрицательного контроля (0% высвобождения) использовался образец НЧ-Cy5 идентичной концентрации после аналогичной процедуры центрифугирования/ декантации. Положительный контроль (100% выход DOX) был достигнут с помощью 30-секундной обработки DOX-НЧ-Cy5 при помощи ультразвукового щупа. После вычитания фона поглощение высвободившегося лекарства делили на поглощение изначально загруженного DOX и выражали в %.

2.2.3 Биологическое тестирование наночастиц

Антитела. Антитела к маркеру Ly6g (клон 1A8), конъюгированные с красителем BV421, были приобретены в компании BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA). Антитела к маркеру CD49b (клон HMα2), конъюгированные с красителем PE, были приобретены в компании Biolegend (San Diego, CA).

Клеточные культуры. Клетки 4T1 (аденокарцинома молочной железы мыши) и B16-F10 (меланома мыши) были приобретены в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA, США). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (для 4T1) и DMEM (для B16-F10) (Gibco) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco) и 2 mM L-глутамина (Gibco). Все клеточные линии культивировали при 37 °С и 5% CO₂ в инкубаторе (Sanyo). Клеточную линию, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP), получали путем лентивирусной трансфекции клеточной линии 4T1 (множественность инфицирования = 50) с использованием LVT-Tag GFP (Eurogen, Россия).

Животные и опухолевые модели. Все экспериментальные протоколы для работы с животными были рассмотрены этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и утверждены для проведения (заключения № 25/2017 и 26/2017). Самки мышей породы BALB/с и C57/ b16 возрастом 6-8 недель были приобретены в Центральном питомнике лабораторных животных Академии медицинских наук (Андреевка, Россия) и содержались индивидуально вентилируемых клетках. Во время исследований возраст животных составлял от 7 до 11 недель, вес 20-25 г. Опухоли прививали путем подкожной инъекции $1 \cdot 10^6$ клеток (4T1 или 4T1-GFP) или $6 \cdot 10^6$ клеток и (B16-F10), суспендированных в 50 мкл PBS, в правый/левый бок мыши. Через 7-10 дней, когда размер опухолей достигал около 25 мм^2 , НЧ вводили в хвостовую вену.

Анализ цитотоксичности. Токсичность НЧ для клеточной культуры 4T1 определяли методом стандартного MTS-теста [183]. При постановке экспериментов клетки снимали с субстрата с помощью раствора 0,25 % трипсина-EDTA (Gibco). Клетки рассаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 10^4 клеток/ лунку. Через 24 ч к клеткам добавляли серийные разведения НЧ-PEG, НЧ-Cy5, DOX-НЧ-Cy5 или свободного DOX (каждая точка в 50 мкл 1xPBS, pH 7,4, Gibco). При сравнении цитотоксичности НЧ-PEG и НЧ-Cy5 использовались равные концентрации Fe_3O_4 . При сравнении цитотоксичности DOX-НЧ-Cy5 и свободного DOX использовались одинаковые концентрации DOX. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду для клеток с добавлением 50 мкл 1xPBS. Диметилсульфоксид (ДМСО, 25%) добавляли в культуральную среду в качестве положительного контроля. Затем клетки инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO_2 , после чего среду, содержащую НЧ, тщательно удаляли, клетки промывали PBS. Далее 20 мкл 3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -5- (3-карбоксиметоксифенил) -2- (4-сульфофенил) -2Н-тетразолия (MTS-реагент, Cell Titler 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, США) добавляли в каждую лунку вместе со 100 мкл культуральной среды, согласно инструкции производителя. После 4 ч инкубации при 37°C в темноте микропланшеты помещали на постоянный магнит на 3-5 мин для удаления НЧ из раствора, далее 100 мкл культуральной среды из каждой лунки, содержащей MTS-реагент, аккуратно переносили в новый микропланшет. Поглощение раствора измеряли при длине волны 490 нм. Выживаемость рассчитывалась в процентах по отношению к выживаемости клеток, инкубированными с 1xPBS. Гибель

клеток после инкубации с ДМСО равнялась 100%. Поглощение MTS-реагента в культуральной среде без клеток принимали равной нулю.

Детекция активных форм кислорода (АФК) проводилась с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H2DCFDA). Клетки рассаживали в 24-луночные планшеты при концентрации 10^5 клеток/ лунку. Через 24 ч к клеткам добавляли серийные разведения НЧ-PEG, диспергированных в 1xPBS (pH 7,4), после чего клетки инкубировались с НЧ в течение 4 ч или 24 ч в конечной концентрации 16; 49; 91; 193 и 333 мкг·мл⁻¹ клеточной среды в лунке. Клетки, инкубированные с добавлением 1xPBS и 1 mM H₂O₂, использовали в качестве отрицательного и положительного контроля соответственно. Чтобы обнаружить АФК в клетках после инкубации с НЧ, культуральную среду удаляли и к клеткам добавляли HBSS (pH = 7,4, Gibco), содержащий 2 mM L-глутамин (Gibco) и 10 mM HEPES. Далее незафиксированные клетки окрашивали H2DCFDA (Life Technologies), разведенным в ДМСО, в конечной концентрации 2 мкМ, в течение 30 мин (стандартный метод выявления АФК в клетках [184]). Далее клетки тщательно отмывали от красителя 3 раза по 5 мин свежим раствором HBSS и анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS (Life Technologies), объектив PlanFluor 20x/0,45, канал GFP (возбуждение 470/22 нм, эмиссия 510/42 нм).

Определение степени гемолиза. Гемолитическую активность НЧ оценивали *ex vivo* согласно литературному протоколу [185] с изменениями. 0,5 мл мышинной крови получали путем сердечной пункции и центрифугировали (10 мин, RCF 900G). Далее супернатант отделяли, а эритроциты ресуспендировали в 1xPBS для удаления следов плазмы. Стадию промывки повторяли дважды, после чего эритроциты редиспергировали в 1xPBS в концентрации 4×10^9 клеток·мл⁻¹. 0,5 мл НЧ-PEG в 1xPBS (серийные разведения в диапазоне 3-330 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄) смешивали с 25 мкл эритроцитов. Смеси инкубировали при 25 ° С при непрерывном перемешивании в течение требуемого времени (10 мин или 24 ч), а затем центрифугировали (5 мин, RCF 900G). Поглощение раствора измеряли на длине волны 540 нм, а процент гемолиза оценивали по сравнению с положительным (0,5 мл DI H₂O) и отрицательным (0,5 мл 1xPBS) контролями и выражали в %.

Динамика накопления НЧ-Су5 и DOX в клетках. Клетки 4T1 рассаживали на покровные стекла в чашках Петри в концентрации 10^5 клеток·мл⁻¹. Через 24 ч к клеткам добавляли НЧ-Су5 (136 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 8 мкг·мл⁻¹ Су5) или свободный Су5 (8 мкг·мл⁻¹) и инкубировали в течение 15; 30; 45 мин; 1; 2; 4; 6 и 24 ч. В случае второго эксперимента, к клеткам добавляли DOX-НЧ-Су5 (63 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 2 мкг·мл⁻¹ Су5, 18 мкг·мл⁻¹ (31 мкМ) DOX) или свободный DOX (31 мкМ). В требуемые моменты времени клетки фиксировали в 4% формальдегиде (Sigma) в течение 15 мин и анализировали на флуоресцентном

микроскопе EVOS (Life Technologies), объектив PlanFluor 60x/0,75 в канале Cy5 (возбуждение 628/40 нм, эмиссия 692/40 нм). Концентрацию DOX определяли количественно путем измерения интенсивности флуоресценции в канале RFP (возбуждение 531/40 нм, эмиссия 593/40 нм) в ядрах клеток (60-70 клеток на временную точку) в программном обеспечении ImageJ. Интенсивность флуоресценции в исходных клетках принимали за ноль. Экспозиция регулировалась отдельно для каждого канала и поддерживалась постоянной во время всех измерений.

Конфокальная микроскопия. Клетки 4T1 рассаживали в специальную чашку Петри марки SPL диаметром 30 мм с покровным стеклом, закрывающим отверстие на дне (Biolab, Корея) в концентрации 10^5 клеток·мл⁻¹. Через 24 ч к клеткам добавляли НЧ-Су5 (33 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄). Последовательность изображений (Z-стеки, 8 шагов по 500 нм каждый) была получена после 30-минутной совместной инкубации с использованием инвертированного микроскопа Nikon A1r MP (Nikon, Япония), объектив 60x/1,49 (масляная иммерсия). Максимальные проекции вдоль X, Y и Z-осей получали с использованием программного обеспечения NIS-elements AR.

MPT in vitro. Для *in vitro* исследований скорость T₂-релаксации протонов воды в присутствии НЧ-PEG измерялась в пробирках на 500 мкл при 18 °C в томографе ClinScan 7 Тл (Bruker BioSpin). Изображения регистрировали в режиме Spin Echo со следующими параметрами: TR = 10 с, TE = 16, 24, ..., 256 мс, угол поворота = 180°, разрешение 640x448 пикселей, поле обзора 120 x 82,5 мм². Интенсивность сигналов из интересующих областей определялась с использованием программы ImageJ, а время T₂-релаксации рассчитывалось путем экспоненциальной аппроксимации как функция TE. Угол наклона зависимости обратного времени T₂-релаксации от концентрации железа в растворе соответствовал R₂-релаксивности для НЧ-PEG в воде и культуре клеток 4T1. Для последнего эксперимента клетки инкубировали с НЧ-PEG (100 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 15 мкг·мл⁻¹ Au) в течение 48 ч. В качестве контроля использовали клетки, инкубируемые в культуральной среде. НЧ, не связанные с клетками, удаляли путем промывки последних PBS-буфером, после чего клетки суспендировали в 2% агарозном геле.

Гипертермия in vitro. Эксперименты ГМЧ *in vitro* проводились с использованием коммерческого индуктора МП мощностью 4,5 кВт, работающего на частоте 765 кГц и индукции 30 мТл. Каждый цикл измерения включал стадию нагрева и охлаждения. Температуру непрерывно регистрировали (с шагом 0,4 с) с помощью волоконно-оптического зонда на основе GaAs, погруженного в виалу, содержащую 1 мл раствора НЧ-PEG в серийных разведениях. Эффективность нагрева (SLP) на единицу массы магнитного материала (в Вт·г⁻¹), определяли по формуле (5):

$$SLP = C \frac{\Delta T}{\Delta t} \frac{m}{m_{Fe}}, \quad (5)$$

где C – удельная теплоемкость коллоидного раствора НЧ (принимается равной теплоемкости воды = 4,16 Дж/(г·К)), m – масса раствора, m_{Fe} – масса железа, содержащегося в растворе, а $\Delta T/\Delta t$ – скорость повышения температуры со временем на начальном участке кривой нагрева, аппроксимируемой прямой (К/с).

Анализ цитотоксичности после действия МП. Клетки рассаживали в лунки планшета Stripwell 96 (Corning) в концентрации 6000 клеток на лунку. Клетки подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток EVE. Через 2 дня среду из клеток заменяли на 200 мкл раствора НЧ-PEG в культуральной среде RPMI (конечная концентрация НЧ 3,6 мг·мл⁻¹ Fe), после чего образцы подвергались воздействию высокочастотного МП (индуктор TOR Ultra HT, ООО «Наноматериалы», Россия) в течение 15 или 30 мин сразу или через 6 ч после инкубации НЧ с клетками. Использовалась амплитуда МП 25 мТл, а частоту регулировали в диапазоне 261-393 кГц, так, чтобы поддерживать постоянную температуру 46±1 °С (детектировали камерой и программным обеспечением Seek Thermal). В качестве контролей использовали клетки, инкубированные культуральной среде RPMI, а также клетки в среде с идентичной концентрацией НЧ, инкубировавшиеся при 37 °С в инкубаторе. После обработки МП среду с НЧ заменяли на 100 мкл новой культуральной среды, и в каждую лунку добавляли 20 мкл 3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -5 - (3-карбоксиметоксифенил) -2- (4-сульфофенил) -2Н-тетразолия (MTS-реагент, Cell Titler 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, США). После инкубации в течение 4 ч при 37°С в темноте лунки помещали на постоянный магнит для удаления НЧ из раствора, и 100 мкл культуральной среды из каждой лунки, содержащей MTS-реагент, аккуратно переносили в новый микропланшет. Поглощение раствора измеряли при длине волны 490 нм. Выживаемость рассчитывалась в процентах по отношению к выживаемости клеток, инкубированными с 1хPBS. Гибель клеток после инкубации с ДМСО равнялась 100%. Поглощение MTS-реагента в культуральной среде без клеток принимали равной нулю.

Детекция апоптоза/некроза. Параллельно с подготовкой образцов для MTS-теста, механизм клеточной гибели определяли с использованием набора для детекции апоптоза/некроза (Abcam). Краситель Apoptin Deep Red окрашивает фосфатидилсерин на мембране апоптотических клеток, а краситель Nuclear Green – клетки с потерей целостности плазматической мембраны (т.е. клетки на поздней стадии апоптоза или некротические клетки). После обработки МП клетки дважды промывали HBSS (Gibco), содержащим 2 mM L-глутамин (Gibco) и 10 mM HEPES (Helicon, pH 7,4), и прижизненно окрашивали набором для детекции апоптоза/некроза, после чего инкубировали в темноте при

комнатной температуре в течение 40 мин и снова промывали HBSS 2 раза. В качестве контролей использовали клетки, инкубированные культуральной среде RPMI, а также клетки в среде с идентичной концентрацией НЧ, инкубировавшиеся при 37 °С в инкубаторе. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS (Life Technologies), объектив PlanFluor 10x/ 0,3. Дальнейшая обработка фотографий была выполнена с помощью программного обеспечения ImageJ.

Детекция активных форм кислорода (АФК) после воздействия МП также проводилась с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H2DCFDA). В этом случае незафиксированные клетки, подвергавшиеся действию МП, дважды промывали HBSS, содержащим 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES (pH 7,4), и окрашивали 2 мкМ раствором H2DCFDA (Life Technologies) в течение 30 мин при 37°C в темноте. Затем клетки осторожно промывали HBSS 3 раза в течение 5 мин. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS, объектив PlanFluor 10x/ 0,3. Обработка фотографий выполнена с помощью программного обеспечения ImageJ.

Атомно-эмиссионная спектроскопия. Для исследований *in vitro* клетки 4T1 высаживали в фальконы площадью 75 см² и культивировали в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли НЧ-PEG в 1хPBS (конечная концентрация 100 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄ и 15 мкг·мл⁻¹ Au) и инкубировали в течение 48 ч при 37 °С и 5% CO₂. После трех стадий промывания PBS клетки отделяли с помощью TrypLE (Gibco), ресуспендировали в культуральной среде, подсчитывали и растворяли в царской водке и разбавляли DI H₂O. В качестве контроля использовали клетки без добавления НЧ. Концентрации Fe и Au определяли методом АЭС, аналогично определению количественного состава НЧ.

Для исследований *ex vivo* через 24 ч после внутривенной инъекции НЧ (6,6 мг·кг⁻¹ Fe₃O₄, 1 мг·кг⁻¹ Au) мышей (n = 3) анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 200 мг·кг⁻¹ кетамина (Московский эндокринный завод, Россия) и 10 мг·кг⁻¹ ксилазина (Нита-Фарм, Россия) с последующей транскардиальной перфузией 30 мл 1хPBS под анестезией. Далее печень, селезенку, почки, легкие, сердце и опухоль извлекали, взвешивали и растворяли в царской водке в течение 24 ч. Количественное определение концентраций железа и золота проводили с помощью АЭС, как было описано выше. В качестве контроля (n = 3) для измерения эндогенного уровня Fe и Au использовали органы животных, которым не вводили НЧ. Полученные значения вычитались из соответствующих величин накопления Fe и Au в опытной группе, после чего получали концентрацию Fe и Au, связанную с введением НЧ (мкг·г⁻¹ ткани). Расчеты эффективности доставки НЧ были основаны на концентрации Fe и Au в опухолевых тканях, массе опухоли и вводимой дозе.

Интравитальная микроскопия. Мышей анестезировали внутривенной инъекцией $200 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ кетамина и $10 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ ксилазина, после чего в хвостовую вену вводили катетер (полиэтиленовая трубка $0,28 \times 0,60 \text{ мм}$ (InStech Laboratories, Inc., Plymouth Meeting PA, USA) с иглой диаметром 30 г) для доставки флуоресцентно меченых антител ($5\text{-}10 \text{ мкг}$) и анестетиков. Температура тела поддерживалась при помощи подогреваемого столика (37°C). НЧ-Cy5 или NRed-НЧ-Cy5 ($3 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$) вводили через хвостовую вену. Подготовка препарата опухоли для визуализации проводилась согласно [186]. Вдоль позвоночника производился срединный разрез, после чего отделяли кожный лоскут с опухолью от прилежащих тканей. Тонкую мембрану соединительной ткани аккуратно удаляли с внутренней поверхности опухоли. Края кожного лоскута фиксировали при помощи шовного материала, чтобы стабилизировать опухоль и сосуды для визуализации. Интравитальную микроскопию выполняли с использованием инвертированного микроскопа Nikon A1r MP (Nikon, Япония). Для кинетических исследований измеряли интенсивность флуоресценции внутри сосудов и вне сосудов (в опухолевой ткани) с использованием программного обеспечения NIS-Elements AR (Nikon, Japan).

Флуоресцентная визуализация in vivo (IVIS). Животных с привитыми с двух сторон опухолями 4T1 ($n = 3$) анестезировали изофлураном и визуализировали с использованием прибора IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer) на длинах волн возбуждения/ эмиссии $640/680 \text{ нм}$ до и $1\text{-}24 \text{ ч}$ после внутривенной инъекции НЧ ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$). Для автоматической коррекции флуоресценции применялся спектральный протокол разделения. Средняя интенсивность флуоресценции измерялась в области интереса при помощи программы Living Image 4.3 (Perkin Elmer), после чего рассчитывалось соотношение сигнала «опухоль/ печень».

MPT vivo. МРТ-изображения *in vivo* были получены с использованием объемной катушки диаметром 20 см в качестве передатчика и 4-сегментной поверхностной катушки в качестве приемника радиочастотного сигнала. Мышей BALB/ с привитыми с двух сторон опухолями 4T1 ($n = 3$) и мышей C57/ bl6 с привитой с правой стороны опухолью B16-F10 ($n = 2$), вводили в наркоз при помощи изофлурана. МРТ-изображения были получены до и $0,5\text{-}24 \text{ ч}$ после внутривенной инъекции НЧ ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$) с использованием следующих настроек: 1) T_2 -взвешенные изображения в режиме турбулентного спин-эха (TSE) с жироподавлением были сделаны в поперечных плоскостях ($\text{TR} = 3000 \text{ мс}$, $\text{TE} = 38 \text{ мс}$, $\text{FOV} = 21 \times 30 \text{ мм}$, базовое разрешение (136×192); 2) T_2^* -взвешенные изображения в режиме взвешенного градиентного эха (GRE) были сделаны в поперечных плоскостях ($\text{TR} = 400 \text{ мс}$, $\text{TE} = 10 \text{ мс}$, $\text{FOV} = 27 \times 35 \text{ мм}$, базовое разрешение (200×256). Изображения обрабатывали в программе RadiAnt DICOM Viewer.

Глава 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Синтез наночастиц магнетит-золото с различным размером магнитной составляющей

В рамках оптимизации физических свойств конечных гибридных материалов, а именно увеличения намагниченности насыщения и эффективной анизотропии для повышения R_2 -релаксивности в МРТ и SLP в ГМЧ, одной из задач работы являлось варьирование размера и формы магнитной компоненты. Ниже приведены результаты синтеза НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ и Fe_3O_4 -Au различного диаметра.

3.1.1 Синтез наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ со структурой «ядро-оболочка»

Первой стадией синтеза НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ со структурой «ядро-оболочка» является синтез НЧ Fe_3O_4 . Для получения НЧ Fe_3O_4 с целью последующего покрытия золотой оболочкой были выбраны четыре методики, описанные в литературе (см. главу 2), позволяющие варьировать размер НЧ. На рисунке 2 представлены изображения НЧ Fe_3O_4 после синтеза, полученные методом ПЭМ. Информация о среднем размере и морфологии НЧ содержится также в таблице 2. Можно видеть, что в результате синтеза были получены НЧ Fe_3O_4 размером от 9 до 41 нм, при этом образцы 1 и 2 имеют сферическую форму, а образцы 3 и 4 – кубическую.

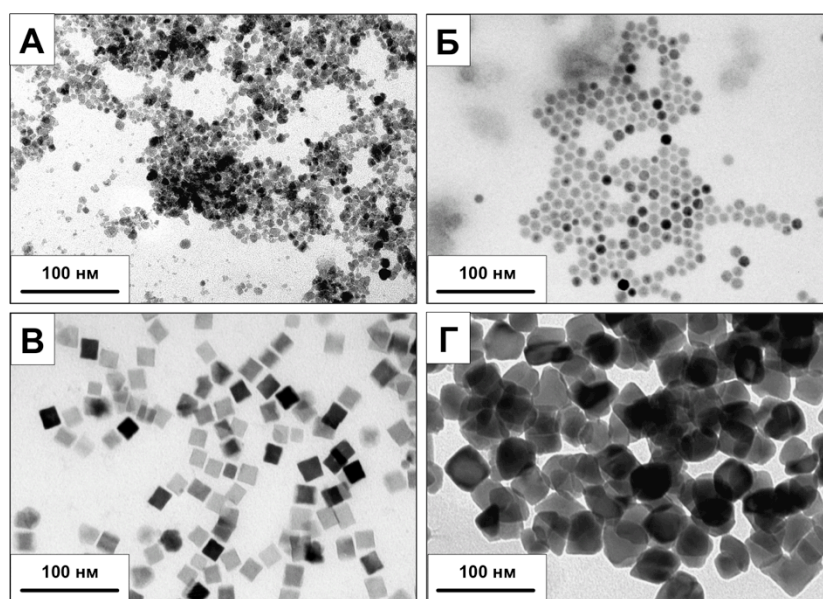


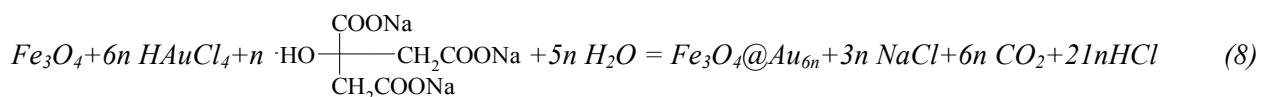
Рисунок 2. ПЭМ-микрофотографии НЧ Fe_3O_4 : А) образец 1; Б) образец 2; В) образец 3; г) образец 4

Для дальнейшего покрытия золотой оболочкой НЧ Fe_3O_4 промывали раствором 2М HClO_4 , либо 0,1 М ТМАОН. Обработка раствором кислоты или основания позволяет стабилизировать НЧ в растворе за счет электростатического взаимодействия. Также из литературы [187] известно, что хлорная кислота способна селективно переводить в раствор ионы Fe^{2+} на поверхности НЧ, что является необходимым условием для улучшения их коллоидной стабильности, а также приближает состав поверхности НЧ к маггемиту и, согласно литературным данным, повышает эффективность покрытия золотой оболочкой [45,47]. После этого НЧ Fe_3O_4 диспергировали в DI H_2O .

Таблица 2. Размер и морфология полученных НЧ Fe_3O_4 по данным ПЭМ

Образец	Средний размер НЧ, нм	Морфология НЧ
1	9 ± 2	сферическая
2	15 ± 3	сферическая
3	26 ± 3	кубическая
4	41 ± 5	кубическая

Основной методикой для покрытия золотом было выбрано восстановление тетрахлороаурата (III) водорода HAuCl_4 на поверхности НЧ Fe_3O_4 с помощью цитрата натрия при кипячении, уравнение реакции которого может быть записано как (8):



Для всех образцов синтез проводили по стандартному протоколу, взятому из литературы [47], после чего по результатам ПЭМ был вычислен средний размер получившихся НЧ, приведенный в таблице 3. Можно видеть, что размер НЧ последовательно увеличивается при увеличении исходных НЧ Fe_3O_4 .

Таблица 3. Размер НЧ до и после реакции восстановления HAuCl_4

Образец	Средний размер исходных НЧ Fe_3O_4 , нм	Средний размер НЧ после проведения реакции, нм
1А	9	21
2А	15	35
3А	26	41
4А	41	59

3.1.2 Доказательство структуры «ядро-оболочка»

Продуктом реакции покрытия золотой оболочкой во всех случаях являлась смесь НЧ Fe_3O_4 , а также НЧ, содержащих золото (процедура очистки образцов будет описана ниже). В то же время, важнейшей характеристикой синтезированных материалов является доказательство наличия под оболочкой золота магнитного ядра. Для этого полученные НЧ были исследованы методом ПЭМ высокого разрешения, а также РСМА. Репрезентативные ПЭМ-микрофотографии, а также соответствующие им спектры представлены на рисунках 3 и 4.

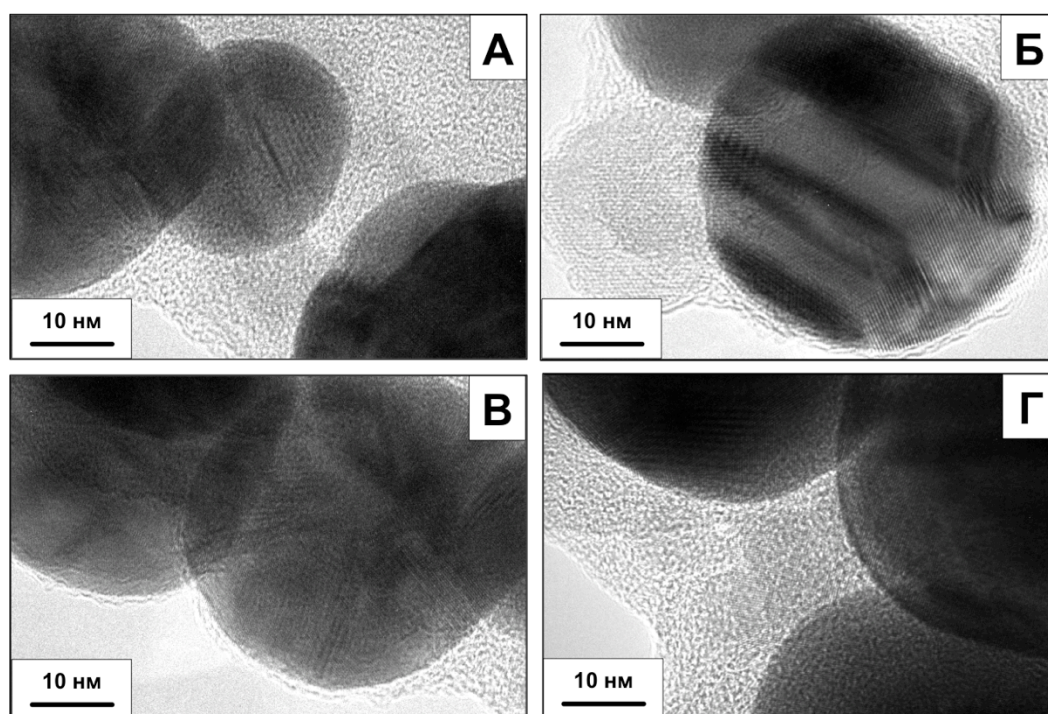


Рисунок 3. ПЭМ-микрофотографии высокого разрешения НЧ, полученных реакцией восстановления HAuCl_4 в присутствии НЧ Fe_3O_4 : А) образец 1А; Б) образец 2А; В) образец 3А; г) образец 4А

По результатам РСМА, только для образца 1А на спектре наблюдается совместное присутствие сигналов Fe (6,4 кэВ, К-линия) и Au (2,1 кэВ, L-линия), что является стандартным методом доказательства структуры $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в литературе [188], в то время как для образцов 2А, 3А и 4А основной пик, соответствующий железу (6,4 кэВ, К-линия), отсутствует, а наличие остальных, менее интенсивных сигналов, можно объяснить наложением спектральных линий от Au, O, C, также присутствующих в НЧ. Можно сделать вывод о том, что в последних трех образцах НЧ, включающие в себя золото, не содержат магнитного ядра. Таким образом, только НЧ Fe_3O_4 наименьшего размера

(9 ± 2 nm) в изучаемых условиях могут быть покрыты золотой оболочкой (образец 1А, содержание Fe по данным РСМА составляет 8 атомных %); дальнейшее рассмотрение образцов 2А, 3А и 4А нецелесообразно.

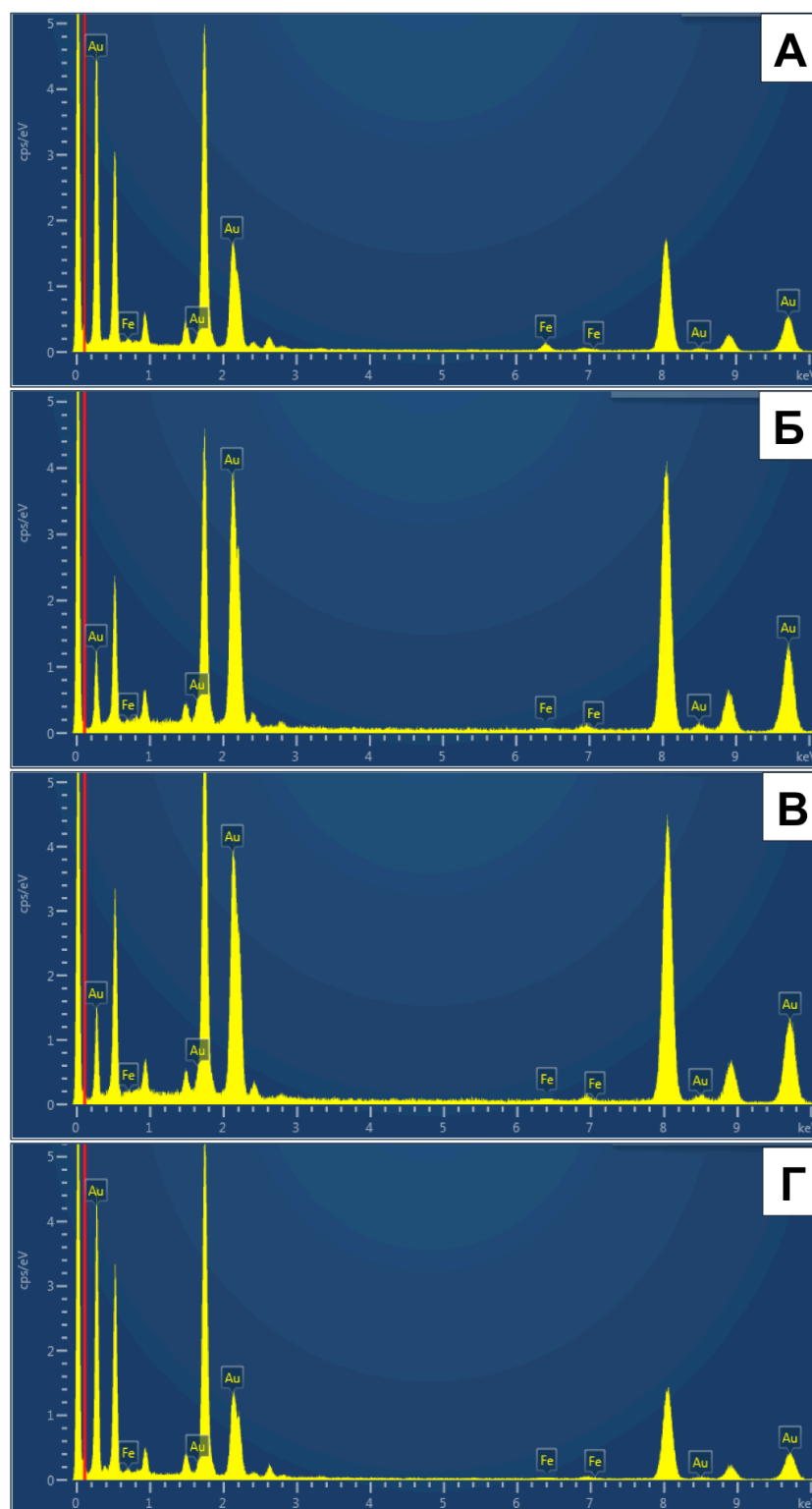
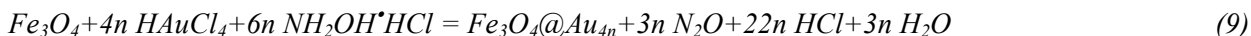


Рисунок 4. Рентгеновские энергодисперсионные спектры НЧ, полученных реакцией восстановления HAuCl_4 цитратом натрия при кипячении в присутствии НЧ Fe_3O_4 : А) образец 1А; Б) образец 2А; В) образец 3А; г) образец 4А

После подтверждения структуры $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ при покрытии золотом НЧ Fe_3O_4 диаметром 9 ± 2 нм была также исследована вторая методика покрытия НЧ Fe_3O_4 оболочкой, а именно восстановление HAuCl_4 с помощью гидрохлорида гидроксилamina $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ при комнатной температуре, уравнение реакции которого может быть записано следующим образом (9):



ПЭМ-микрофотография полученного образца 1Б, а также соответствующий ему рентгеновский энергодисперсионный спектр представлен на рисунке 5. Аналогично образцу 1А, в спектре одновременно присутствуют сигналы Fe (6,4 кэВ, К-линия) и Au (2,1 кэВ, L-линия), при этом оцененное содержание Fe в НЧ составляет 5 атомных %. Средний размер НЧ в образце 1Б – 30 нм.

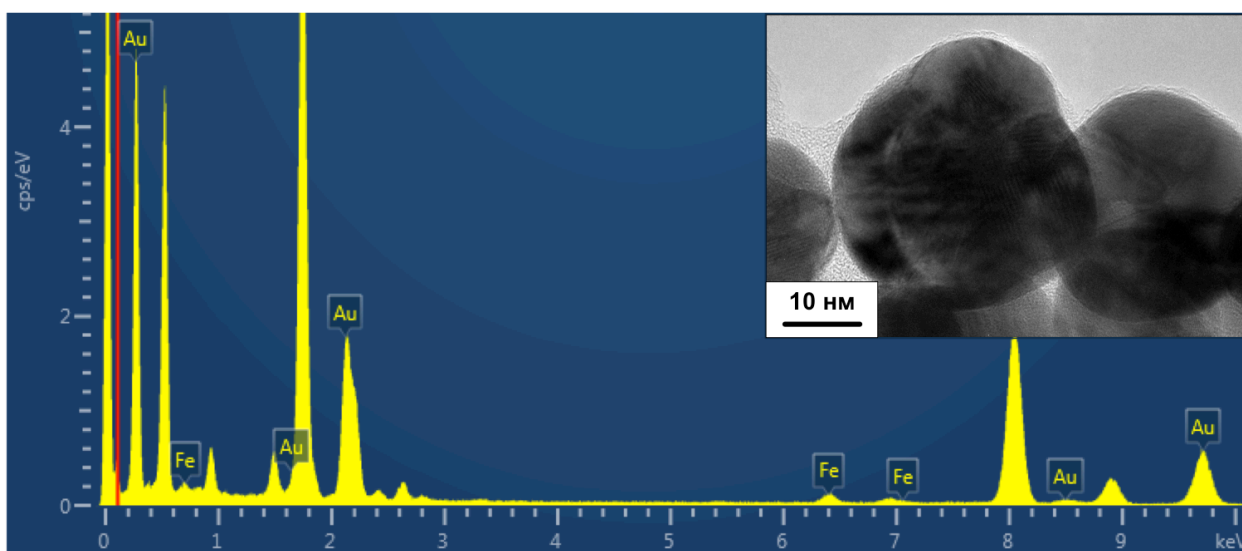


Рисунок 5. Рентгеновский энергодисперсионный спектр образца 1Б, полученного при восстановлении HAuCl_4 гидрохлоридом гидроксилamina при комнатной температуре в присутствии НЧ Fe_3O_4 , а также ПЭМ-микрофотография высокого разрешения (врезка)

Далее необходимо было выяснить, сохраняется ли размер НЧ Fe_3O_4 при их покрытии Au. Для визуализации магнетита под оболочкой золота образцы 1А и 1Б были дополнительно исследованы в режиме HAADF-STEM, поскольку НЧ Fe_3O_4 обладают слабым контрастом на светлопольных ПЭМ-изображениях, а НЧ Au – сильным. Кроме того, для образца 1Б было проведено PCMA-картирование (рис. 6).

Согласно данным HAADF-STEM, НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в составе образцов 1А и 1Б действительно имеют структуру «ядро-оболочка», однако средний размер магнитного ядра уменьшается (6 нм по сравнению с 9 нм для исходных магнитных НЧ). Таким образом, можно предположить, что НЧ Fe_3O_4 частично растворяются в ходе покрытия

золотом вследствие образующейся в процессе реакции соляной кислоты (см. уравнения 8 и 9). Из РСМА-карт распределения элементов видна ко-локализация сигналов Fe, Au и самих НЧ. Данный факт также говорит в пользу формирования структуры «ядро-оболочка». Стоит отметить, что из схожих карт распределения Fe и Au выводы о подобном строении НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ делают и другие авторы [174].

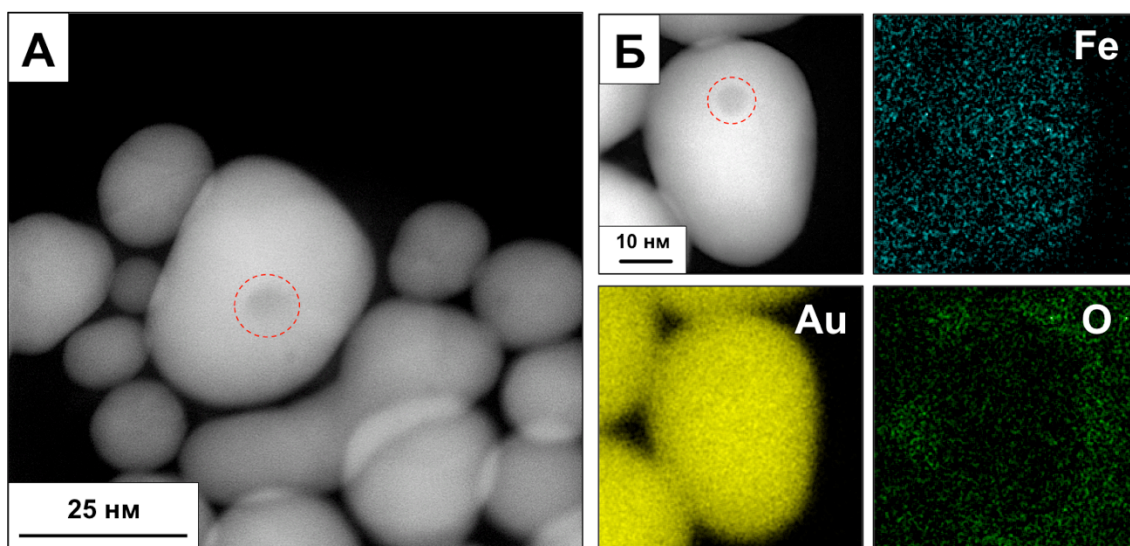


Рисунок 6. Исследования НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в составе образцов 1А (А) и 1Б (Б) методом HAADF-STEM. Предположительная локализация магнитного ядра обозначена красной пунктирной линией. А) ПЭМ-микрофотография образца 1А. Б) ПЭМ-микрофотография, а также РСМА-картирование элементов: Fe, Au, O, образец 1Б

3.1.3 Синтез наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ со структурой «гантель»

НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ со структурой «гантель» синтезировали в атмосфере аргона путем термического разложения пентакарбонила железа на поверхности НЧ Au в высококипящих растворителях с последующим охлаждением до комнатной температуры и окислением на воздухе. При этом НЧ Au, используемые в качестве зародышей, были получены как *in situ* в процессе синтеза (образцы 5 и 6), так и отдельно (образцы 7 и 8) с последующим добавлением в реакционную смесь. Температуру протекания реакции (температуру изотермической выдержки) регулировали, используя в качестве растворителей дифениловый эфир, дибензиловый эфир и 1-октадецен с последовательно увеличивающейся температурой кипения (258°C, 298°C и 310°C, соответственно). Время изотермической выдержки составляло либо 45 мин (стандартный протокол, взятый из литературы), либо 3 часа (модифицированный протокол). Условия синтеза, соответствующие каждому из четырех образцов, отражены в таблице 4.

Таблица 4. Условия синтеза гантелевидных НЧ магнетит-золото

Образец	Получение зародышей Au	Высококипящий растворитель	T изотермической выдержки, °C	t изотермической выдержки, мин
5	<i>in situ</i>	Дифениловый эфир	255-260	45
6	<i>in situ</i>	1-октадецен	300-310	45
7	отдельно	Дифениловый эфир	255-260	180
8	отдельно	Дибензиловый эфир	285-295	180

Размер и морфология НЧ после синтеза были охарактеризованы методом ПЭМ (рис. 7). На представленных микрофотографиях можно видеть попарно соединенные на границе раздела фаз НЧ магнетита и золота, образующие так называемую гантелевидную структуру. При повышении температуры кипения растворителя и увеличении времени изотермической выдержки диаметр НЧ магнетита, входящих в состав «гантелей», увеличивается от 6 до 44 нм, что отражено в таблице 5. Одновременно с этим размер НЧ золота также возрастает, но менее значительно (с 3 до 11 нм).

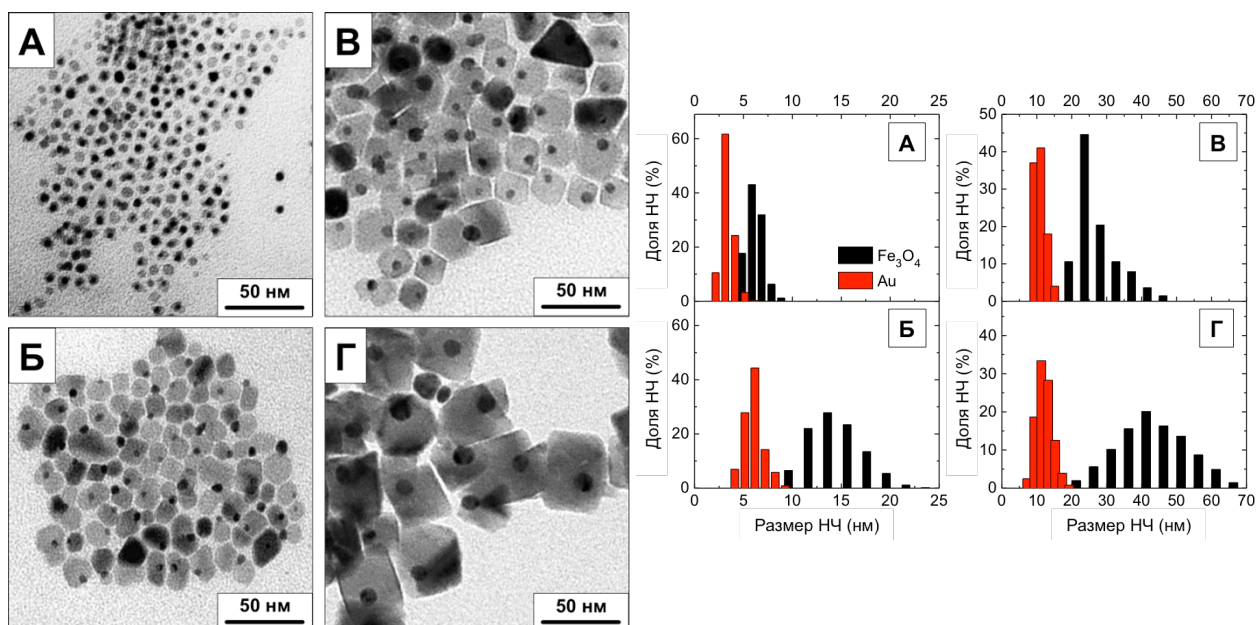


Рисунок 7. ПЭМ-микрофотографии НЧ Fe₃O₄-Au: (А) образец 5; (Б) образец 6 (НЧ Au синтезированы *in situ*); (В) образец 7; (Г) образец 8 (НЧ Au синтезированы отдельно), а также распределения по размеру для соответствующих образцов

Важно отметить, что в состав НЧ Fe₃O₄-Au, для получения которых использовались синтезированные *in situ* НЧ золота, входят сферические или слабо ограненные НЧ

магнетита (рис. 7, А и Б), в то время как магнетит, выращенный на отдельно синтезированных зародышах золота, имеет ярко выраженную октаэдрическую форму (рис. 7, В и Г).

Таблица 5. Размер, морфология и структура НЧ Fe_3O_4 -Au, охарактеризованные методами ПЭМ и РФА

Образец	ПЭМ		РФА						
	Форма НЧ Fe_3O_4	Размер НЧ (нм)		a (нм)		Размер кристаллитов (нм)		Объемная доля фаз (%)	
		Fe_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au
5	сферическая	$6,3 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,6$	$0,8376 \pm 0,0005$	$0,4060 \pm 0,0005$	$4,0 \pm 1,0$	$2,0 \pm 1,5$	$92,9 \pm 4,0$	$7,1 \pm 4,0$
6	ограниченная сферическая	$14,6 \pm 2,7$	$5,9 \pm 1,0$	$0,8384 \pm 0,0004$	$0,4068 \pm 0,0004$	$15,0 \pm 2,0$	$4,0 \pm 1,0$	$95,5 \pm 2,0$	$4,5 \pm 2,0$
7	октаэдрическая	$25,1 \pm 5,0$	$9,2 \pm 2,1$	$0,8394 \pm 0,0002$	$0,4076 \pm 0,0002$	$26,0 \pm 1,1$	$4,5 \pm 0,4$	$95,3 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,7$
8	октаэдрическая	$43,9 \pm 10,6$	$10,9 \pm 2,3$	$0,8390 \pm 0,0001$	$0,4082 \pm 0,0002$	$16,8 \pm 0,4$	$9,5 \pm 0,6$	$95,0 \pm 1,5$	$5,0 \pm 1,5$

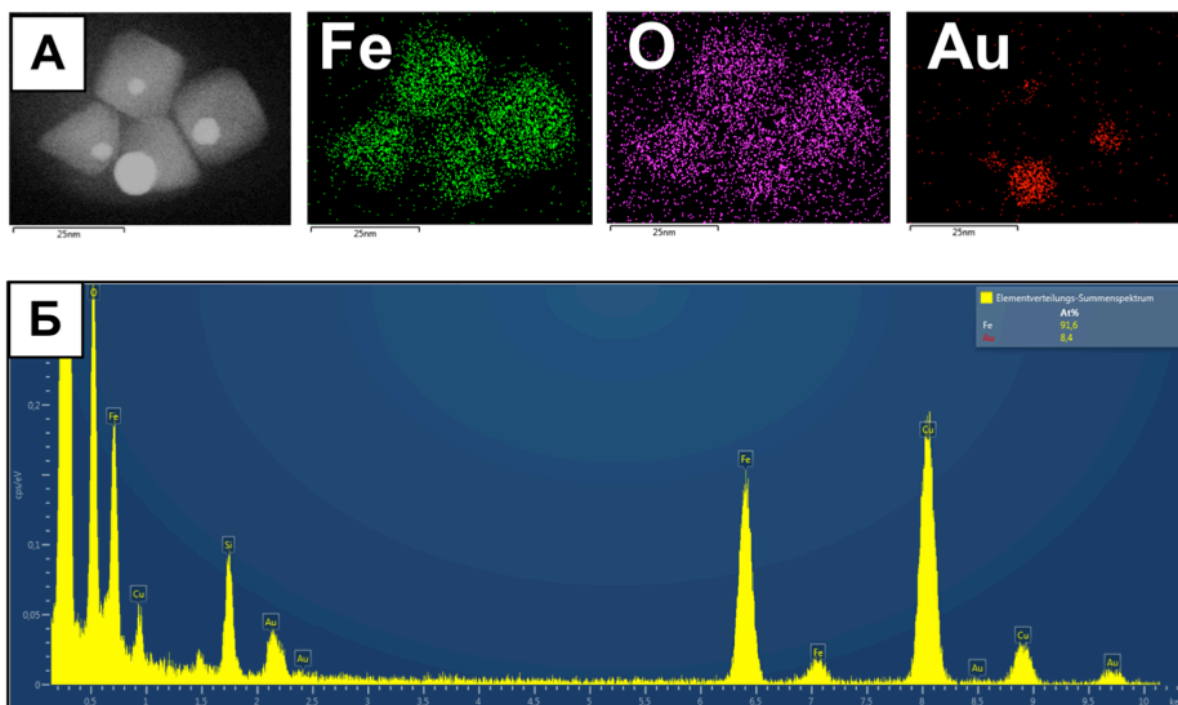


Рисунок 8. Исследование НЧ Fe_3O_4 -Au в составе образца 7 методом HAADF-STEM. (А) ПЭМ-микрофотография, а также РСМА-картирование элементов: Fe, Au, O. (Б)

Рентгеновский энергодисперсионный спектр

Увеличение времени изотермической выдержки также является немаловажным фактором для увеличения размера и степени огранки НЧ. В литературе существует лишь несколько примеров получения НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ с формой НЧ магнетита, близкой к октаэдрической [58,189]. При этом НЧ, полученные в данной работе, превосходят существующие аналоги в плане качества структуры магнетита, а именно степени его кристалличности и стехиометрии соотношения $\text{Fe}:\text{O}$, что напрямую сказывается на физических свойствах материала (см. далее). Гантелевидная структура образцов и отличие в контрастности входящих в их состав НЧ Fe_3O_4 и Au явно видны на ПЭМ-микрофотографиях. Тем не менее, в образце 7 НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ были исследованы методами HAADF-STEM и PCMA (как общий спектр, так и картирование). Пространственная локализация сигналов от атомов Fe, O и Au наглядно демонстрирует, что в состав гантелевидной структуры входят отдельные НЧ Fe_3O_4 и Au, и в системе отсутствуют твердые растворы (рис. 8).

Таким образом, в результате синтеза НЧ магнетит-золото были получены образцы 1А и 1Б со структурой $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, и в обоих случаях размер магнитного ядра (максимально возможный в выбранных условиях покрытия золотом) составил 6 ± 2 нм с толщиной оболочки 8-13 нм. При этом структура $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ дает возможность варьировать размер магнитной компоненты в широких пределах – были получены образцы 5 – 9 с последовательно увеличивающимся диаметром НЧ Fe_3O_4 от 6 ± 1 до 44 ± 10 нм.

3.2 Исследование и оптимизация физических свойств наночастиц магнетит-золото

3.2.1 Структура и фазовый состав наночастиц

После характеристики отдельных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в составе образцов 1А и 1Б, их было необходимо подготовить для анализа статистически значимого числа НЧ методами РФА и магнитометрии. Как уже упоминалось ранее, в процессе реакций (1) и (2) образуется смесь НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, существенного количества непокрытых НЧ Fe_3O_4 и небольшой фракции НЧ Au, не содержащих магнитного ядра. С целью очистки от непокрытых НЧ Fe_3O_4 была разработана методика центрифугирования с оптимизацией скоростей, при которых более крупные и тяжелые наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ выпадают в осадок, в то время как более легкие частицы Fe_3O_4 остаются в надосадочной жидкости [46]. ПЭМ-микрофотографии образцов 1А и 1Б после очистки, а также гистограммы распределения по размерам приведены на рисунке 9. Средний размер НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ после

очистки в пределах погрешности не изменился и составил 22 ± 3 нм и 32 ± 5 нм для образцов 1А и 1Б, соответственно. С учетом среднего размера магнитного ядра = 6 нм, толщина оболочки в образце 1А может быть оценена в 8 нм, в образце 1Б – в 13 нм.

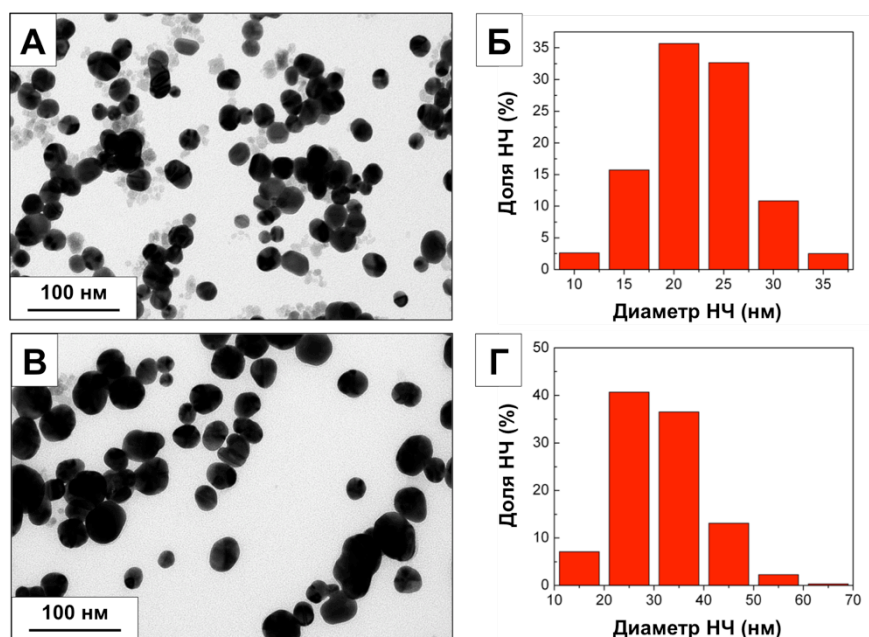


Рисунок 9. ПЭМ-микрофотографии (А, В) и распределение по размеру (Б, Г) НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$: А-Б) образец 1А; В-Г) образец 1Б

Количественно состав НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ оценивали методами РСМА (определяя атомное соотношение Fe/Au) и АЭС (определяя массовое соотношение Fe/Au). Полученные значения (сведены в таблицу 6) также сравнивали с теоретическими, рассчитанными на основе данных ПЭМ по формуле 10 в предположении идеальных сферических НЧ и значений плотностей $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, взятых из литературы [190,191]:

$$\frac{m(\text{Fe}_3\text{O}_4)}{m(\text{НЧ})} = \frac{V_{\text{Fe}_3\text{O}_4} \times \rho_{\text{Fe}_3\text{O}_4}}{(V_{\text{НЧ}} - V_{\text{Fe}_3\text{O}_4}) \times \rho_{\text{Au}} + V_{\text{Fe}_3\text{O}_4} \times \rho_{\text{Fe}_3\text{O}_4}} \quad (10)$$

Таблица 6. Содержание Fe_3O_4 в НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, определенное при помощи различных методов

Образец	ПЭМ			РСМА		АЭС	
	Диаметр ядра, нм	Диаметр НЧ, нм	$m(\text{Fe}_3\text{O}_4)/m(\text{НЧ})$	Fe (ат. %)/ Au (ат. %)	$m(\text{Fe}_3\text{O}_4)/m(\text{НЧ})$	$m(\text{Fe})/m(\text{Au})$	$m(\text{Fe}_3\text{O}_4)/m(\text{НЧ})$
1А	6	22	0,016	8/ 92	0,033	0,165	0,076
1Б	6	32	0,006	5/ 95	0,020	0,007	0,003

Отличие экспериментальных данных РСМА и АЭС от расчетных по данным ПЭМ для образца 1А (большее содержание Fe_3O_4) может быть объяснено наличием более чем одной магнитной НЧ под золотой оболочкой, отличием формы частиц от идеальной сферической, а также небольшой фракцией непокрытых НЧ Fe_3O_4 , оставшейся после очистки. В случае образца 1Б по данным АЭС наблюдается заниженное по сравнению с теоретическим, содержание Fe_3O_4 , что может являться следствием присутствия в образце НЧ Au, не содержащих магнитного ядра. Состав НЧ Fe_3O_4 -Au определяли методами РФА и АЭС, что отражено в таблице 7. Для образцов 6 – 8 данные обоих методов совпадают в пределах 3%. Отличие для образца 5, по-видимому, можно объяснить большей долей магнетита.

Таблица 7. Массовые доли фаз Fe_3O_4 и Au в образцах НЧ Fe_3O_4 -Au

Образец	Массовая доля фаз, % (РФА)		Массовая доля фаз, % (АЭС)	
	Fe_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au
5	78,0±4,0	22,0±4,0	84,7±2,3	15,3±2,3
6	85,2±2,0	14,8±2,0	82,9±1,4	17,1±1,4
7	84,6±0,7	15,4±0,7	85,3±0,9	14,7±0,9
8	83,8±1,5	16,2±1,5	87,5±2,5	12,5±2,5

Структура и фазовый состав НЧ Fe_3O_4 @Au и Fe_3O_4 -Au были исследованы методом РФА. На рисунке 10 представлены данные для образцов 1 (Fe_3O_4), 1А, 1Б (Fe_3O_4 @Au), а также образцов 5 – 8 (Fe_3O_4 -Au). Относительная интенсивность всех пиков, а также их положение на дифрактограмме для образца 1 полностью соответствует структуре магнетита Fe_3O_4 (ICDD PDF-2 №00-019-0629), для образцов 1А и 1Б – структуре золота Au (ICDD PDF-2 №03-065-8601), для образцов 5, 6, 7 и 8 – суперпозиции структур магнетита и золота, согласно базе данных ICDD PDS. Для каждой фазы из рентгеновских спектров были рассчитаны параметры решетки, размеры кристаллитов и объемная доля (табл. 5 и 8).

Вопрос получения той или иной фазы оксида железа в составе НЧ магнетит-золото широко обсуждается в литературе; наиболее распространенными являются Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [12,37,51]. Следует отметить, что они структурно схожи, но различимы по параметру решетки. В случае образца 1 он равен 0,8362 нм, что соответствует промежуточной фазе между Fe_3O_4 ($a = 0,8397$ нм) и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($a = 0,8346$ нм). Поскольку размер кристаллитов в образце 1 в пределах погрешности совпадает с размером НЧ по данным ПЭМ, можно сделать вывод о монокристалличности магнитного ядра.

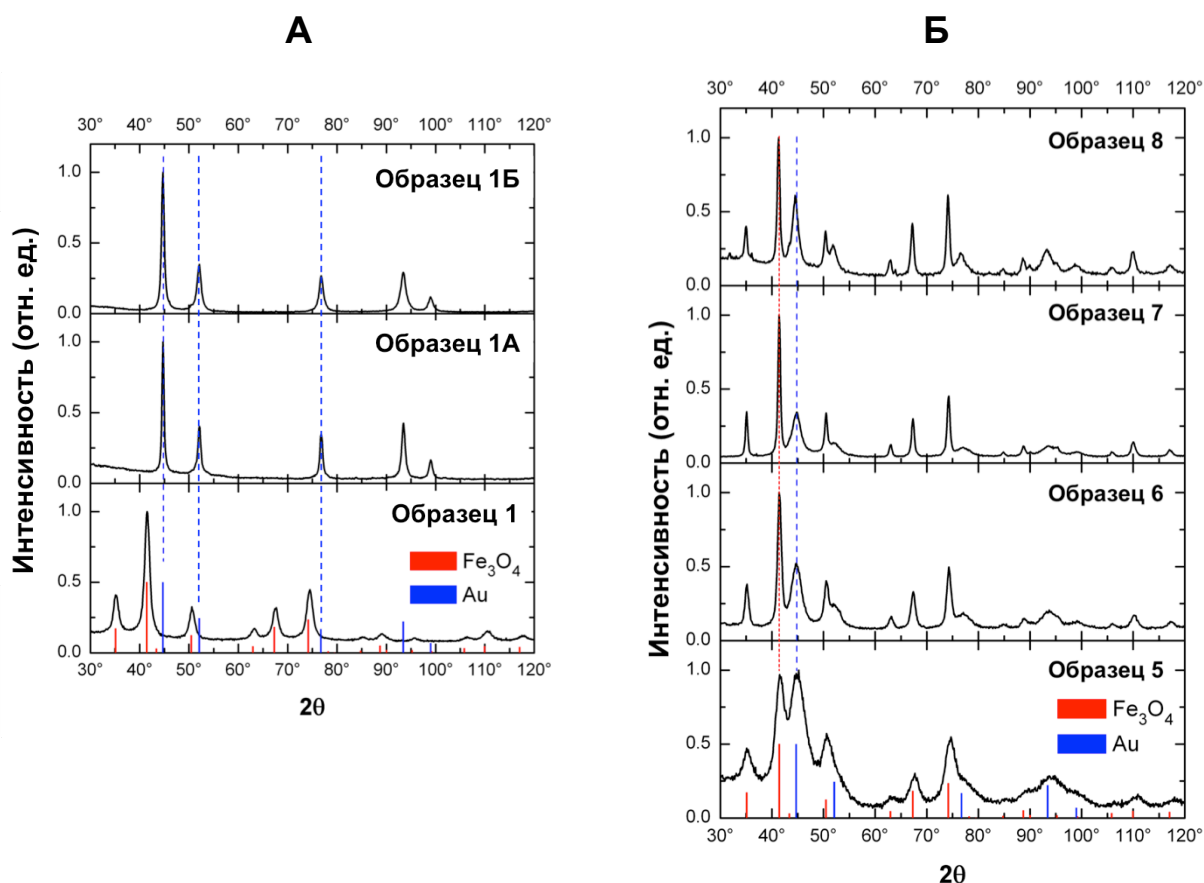


Рисунок 10. Рентгенограммы НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$. Значения по оси Y для каждого спектра нормированы на самый интенсивный пик. Красными и синими линиями отмечены положения по оси X, а также относительные интенсивности «эталонных» фаз Fe_3O_4 и Au

Таблица 8. Кристаллическая структура образцов 1, 1А и 1Б, охарактеризованная методом РФА

Образец	a (нм)		Размер кристаллитов (нм)		Объемная доля фаз (%)	
	Fe_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au
1	$0,8362 \pm 0,0004$	-	$8,0 \pm 1,0$	-	100,0	0,0
1А	-	$0,4078 \pm 0,0004$	-	$14,0 \pm 2,0$	0	100
1Б	-	$0,4078 \pm 0,0002$	-	$15,0 \pm 2,0$	0	100

Заслуживающим внимания фактом является отсутствие пиков Fe_3O_4 на рентгенограммах НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в образцах 1А и 1Б. Эти результаты согласуются с данными ряда статей [46,192], в которых упоминается об «эффекте тяжелых атомов» золота, а именно большем коэффициенте поглощения рентгеновского излучения Au по сравнению с Fe_3O_4 , массовая доля которого в обоих образцах, согласно теоретическим

расчетам, не превышает нескольких % (табл. 6). Также существует мнение, что отсутствие пиков Fe_3O_4 на дифрактограммах связано с толщиной оболочки Au более 5 нм [192]. Параметры решетки обоих образцов соответствуют объемному значению для золота; размер кристаллитов, равный 14-15 нм, с учетом общего диаметра НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (22 либо 32 нм) предполагает поликристаллическое строение золотой оболочки.

Также в настоящей работе важным фактом является 100% соответствие спектра «магнитной» составляющей всех образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ типу кубической структуры шпинели Fd-3m (структуре типа магнетита). Кроме того, согласно данным таблицы 5, в ряду образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ параметр решетки НЧ оксида железа увеличивается от 0,8376 нм для образца 5 (больше, чем для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ аналогичного размера) до 0,8390 – 0,8394 нм для образцов 7 и 8. Можно сделать вывод, что по мере увеличения диаметра магнитных НЧ в составе НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, их структура изменяется от промежуточной между маггемитом и магнетитом до объемного магнетита в случае октаэдрических частиц диаметром 25 нм (образец 7) [193]. Для гантелевидных структур вышеупомянутый факт ранее не был описан в литературе. Наблюдается хорошее соответствие среднего размера кристаллитов по данным РФА и среднего диаметра НЧ по данным ПЭМ, что говорит об их монокристаллической структуре (за исключением образца 8 с поликристаллическими НЧ Fe_3O_4). Кроме того, размер кристаллов Fe_3O_4 можно варьировать, поддерживая постоянное объемное соотношение фаз $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ в пределах 95 ± 2 % (табл. 5).

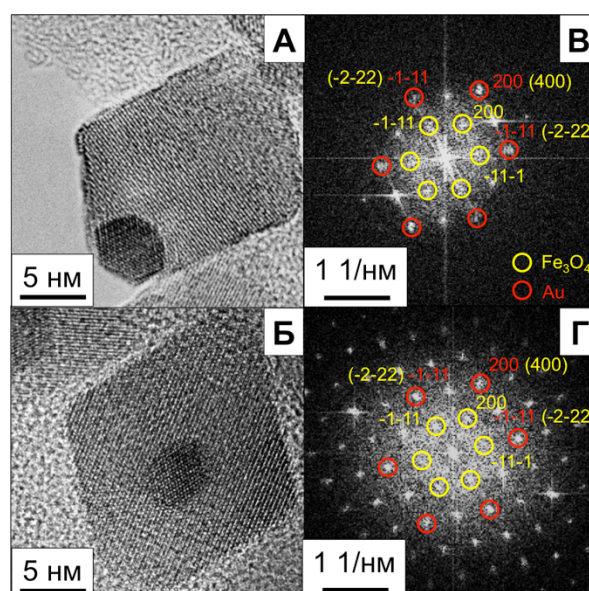


Рисунок 11. ПЭМ-микрофотографии высокого разрешения, а также БПФ-изображения НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$: образец 6 (А, В) и образец 7 (Б, Г). Индексы кристаллографических плоскостей Fe_3O_4 и Au отмечены желтым и красным цветом, соответственно; показана взаимная ориентация направлений [111] и [200]. Ось z соответствует направлению [011] в НЧ

Заключительной частью структурных исследований гантелевидных НЧ стало определение относительной кристаллографической ориентации НЧ Fe_3O_4 и Au, выполненное для образца 6 (НЧ Au синтезированы *in situ*) и образца 7 (с отдельно синтезированными НЧ Au) методом ПЭМ высокого разрешения (рис. 11, А и Б), а также быстрого преобразования Фурье (БПФ, рис. 11, В и Г). В обоих случаях наблюдается эпитаксиальный рост НЧ Fe_3O_4 на НЧ Au, с взаимной ориентацией одноименных кристаллографических плоскостей Au (111) $\parallel$ Fe_3O_4 (111) и Au (200) $\parallel$ Fe_3O_4 (200), в согласии с литературными данными [194,195].

3.2.2 Магнитные свойства наночастиц

Следующим этапом после исследования кристаллической структуры гибридных НЧ магнетит-золото стало изучение их магнитостатических свойств, включающее в себя петли гистерезиса при различных температурах в интервале 5-300 К (рис. 12 и 13), из которых определяли намагниченность насыщения M_S и коэрцитивную силу H_C (табл. 9 и 10). Значения M_S нормировались на содержание Fe_3O_4 , определенное методом АЭС. Для НЧ Fe_3O_4 -Au также записывали кривые охлаждения в нулевом МП и приложенном МП 5 мТл (ZFC/FC кривые, рис. 13, Б), из которых определяли температуру блокировки T_B и температуру Вервея T_V .

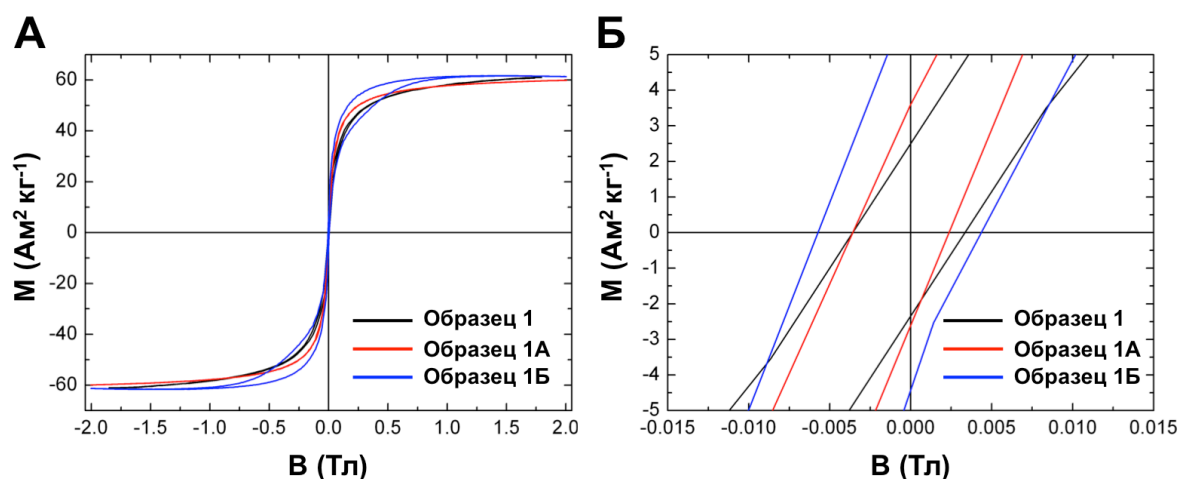


Рисунок 12. Магнитные свойства гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$: Петли гистерезиса образцов в МП ± 2 Тл при $T = 300$ К (А) и их увеличенные вблизи нуля области (Б)

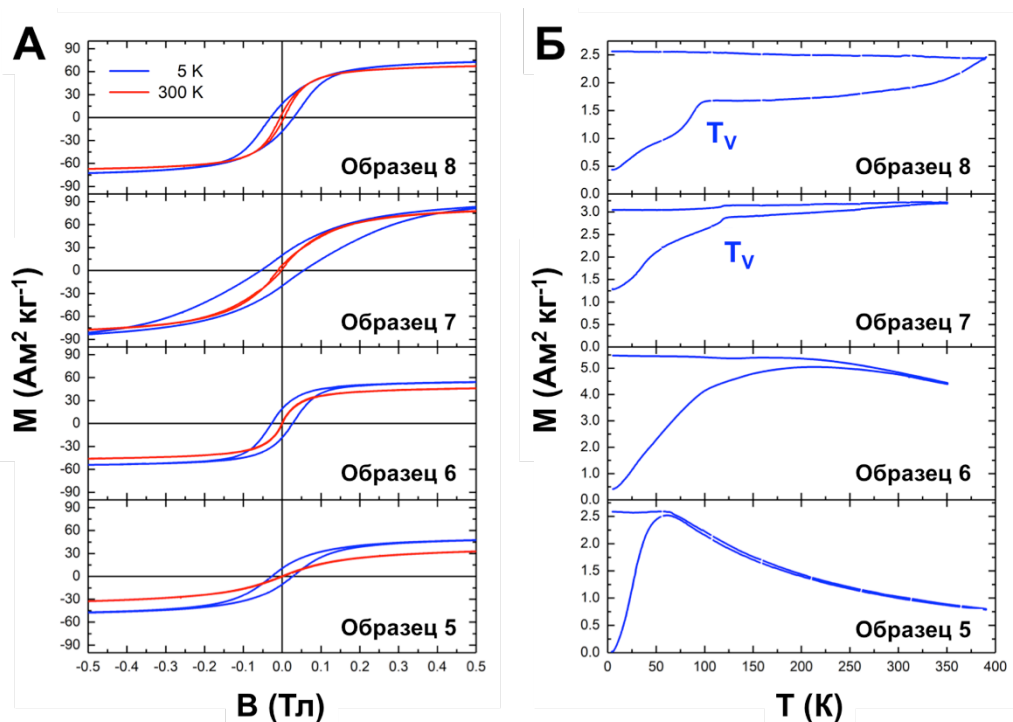


Рисунок 13. Магнитные свойства гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$. А) Петли гистерезиса образцов в МП $\pm 0,5$ Тл при $T = 5$ и 300 К. Б) ZFC/FC кривые образцов в МП $B = 5$ мТл. T_V указывает температуру перехода Вервея для образцов 7 и 8.

Таблица 9. Магнитостатические свойства образцов НЧ Fe_3O_4 и $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ при 300 К (M_S и H_C)

Образец	Намагниченность насыщения M_S , $\text{Am}^2 \cdot \text{кг} (\text{Fe}_3\text{O}_4)^{-1}$	Коэрцитивная сила H_C , мТл
1	$61,3 \pm 2,1$	4 ± 1
1A	$62,4 \pm 3,0$	4 ± 1
1Б	$62,0 \pm 2,9$	5 ± 1

Таблица 10. Магнитостатические свойства образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ при 5 К и 300 К (M_S , H_C , T_B)

Образец	Намагниченность насыщения M_S , $\text{Am}^2 \cdot \text{кг} (\text{Fe}_3\text{O}_4)^{-1}$		Коэрцитивная сила H_C , мТл		Температура блокировки T_B (К)
	$T = 5$ К	$T = 300$ К	$T = 5$ К	$T = 300$ К	ZFC
5	$57,0 \pm 3,0$	$47,6 \pm 2,4$	27 ± 2	5 ± 2	62
6	$70,4 \pm 2,1$	$61,1 \pm 2,0$	28 ± 2	13 ± 2	210
7	$97,1 \pm 2,4$	$86,8 \pm 2,1$	55 ± 2	79 ± 2	310
8	$79,6 \pm 4,6$	$73,6 \pm 4,2$	30 ± 2	55 ± 2	>390

Как видно из рисунков 12, 13 и таблиц 9, 10, при комнатной температуре H_c образцов 1, 1А, 1Б, 5 и 6 составляет менее 15 мТл, следовательно, их можно считать суперпарамагнитными, в то время как образцы 7 и 8 являются ферромагнитными, о чем также свидетельствуют и ZFC/FC кривые на рисунке 13. При низких температурах все образцы НЧ Fe_3O_4 -Au (5 – 8) обладают ненулевой коэрцитивной силой.

Что касается M_s образцов, в случае НЧ Fe_3O_4 и $Fe_3O_4@Au$ она составляет 61-62 $Am^2 \cdot kg (Fe_3O_4)^{-1}$. При сравнении с литературой [13,14] это соответствует переходному состоянию между Fe_3O_4 и γ - Fe_2O_3 , в согласии с данными РФА. Таким образом, золотая оболочка не оказывает влияние на намагниченность насыщения образцов 1А и 1Б. Для НЧ Fe_3O_4 -Au как при 5 К, так и 300 К M_s растет с увеличением размера НЧ: от 47,6 $Am^2 \cdot kg (Fe_3O_4)^{-1}$ для образца 5 до 86,8 $Am^2 \cdot kg (Fe_3O_4)^{-1}$ для образца 7 (при 300 К). В то же время, M_s образца 8 при 300 К достигает только 73,6 $Am^2 \cdot kg (Fe_3O_4)^{-1}$, что происходит, вероятно, из-за уменьшения размеров кристаллитов и окисления поверхности НЧ до γ - Fe_2O_3 [19,196,197]. Важно отметить, что при 5 К значение M_s для образца 7 в пределах погрешности соответствует величине для объемного материала.

С увеличением размера НЧ Fe_3O_4 в составе структур Fe_3O_4 -Au температура их перехода в суперпарамагнитное состояние (T_B) повышается с 62 К для образца 5 до 210 К для образца 6, согласно максимуму ZFC-кривой. T_B образца 7 = 310 К, что близко к комнатной температуре, в то время как для образца 8 она оказалась выше, чем экспериментально доступный диапазон температур (5-390 К). Для образцов 7 и 8 при 123 К и 100 К, соответственно, на ZFC-кривой наблюдается излом, после чего она выходит на плато. Предполагается, что эта особенность связана с переходом Вервея в Fe_3O_4 от моноклинной структуры при низких температурах к кубической структуре шпинели при высоких температурах. В объемном материале данный переход происходит при $T_V = 123$ К [15], что в точности соответствует T_V для образца 7, свидетельствуя о высоком качестве структуры кристаллов Fe_3O_4 . Согласно литературным данным [198], малейшая нестехиометричность магнетита, которую можно выразить формулой $Fe_{3-x}O_4$, с коэффициентом вакансий $x = 0,009$ уже приводит к сдвигу T_V до 110 К [199]. Для образца 8 T_V действительно сдвинута более чем на 20 К, свидетельствуя о более низком качестве структуры НЧ по сравнению с образцом 7. Это может объясняться их поликристалличностью, поскольку средний размер НЧ по данным ПЭМ (44 нм) в 2,5 раза превышает средний размер кристаллитов по данным РФА (17 нм). Напротив, данные параметры для образца 7 идентичны в пределах погрешности. Из ZFC-FC кривых были также определены константы эффективной анизотропии НЧ Fe_3O_4 -Au, они составили 10-11 $кДж \cdot м^{-3}$, что крайне близко к значению для массивного Fe_3O_4 (13 $кДж \cdot м^{-3}$ [17]).

Для того, чтобы подтвердить вывод о структуре объемного магнетита в составе образца 7, было проведено исследование методом Мёссбауэровской спектроскопии (рис. 14, табл. 11).

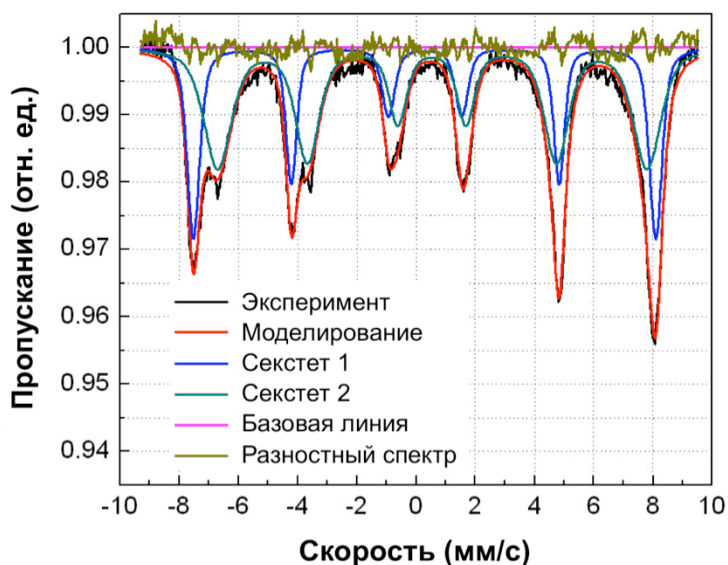


Рисунок 14. Мёссбауэровский спектр НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (образец 7), при $T = 298 \text{ K}$

Таблица 11. Результаты обработки Мёссбауэровского спектра образца 7

Площадь спектра ионов Fe^{3+} в тетраэдрических позициях S_A , (%)	Площадь спектра ионов Fe^{2+} в октаэдрических позициях S_B , (%)	S_A/S_B	Формульный коэффициент вакансий x	$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{\text{общ}}$ (%)
39,9	60,1	0,66	0,03	31

По результатам обработки спектра на рисунке 14 было получено соотношение $S_A/S_B = 0,66$ (табл. 11). Это, в свою очередь, дает величину формульного коэффициента вакансий $x = 0,03$. Таким образом, формулу образца 7 можно записать как: $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}_{0,91}\text{Fe}^{3+}_{2,06}\phi_{0,03}]\text{O}_4$, где доля ионов Fe^{2+} от всех ионов железа составляет 0,31. Данная величина лишь на 0,02 отличается от стехиометричного соотношения $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{\text{общ}} = 0,33$.

Приведенных выше результаты позволяют также оценить общее количество окисленных ионов Fe^{2+} в расчете на одну НЧ, исходя из предположения, что со временем окисление прогрессирует от поверхности к ее центру. Объем НЧ Fe_3O_4 ($V_{\text{НЧ}}$) с диагональю 25 нм можно аппроксимировать объемом эквивалентной сферы с радиусом $R = 12,5 \text{ нм}$ и объемом $V_{\text{НЧ}} = 4/3\pi R^3 = 8177 \text{ нм}^3$. Параметр решетки $a = 0,8394 \text{ нм}$, вычисленный по данным РФА, переводится в объем элементарной ячейки $V_{\text{ЭЯ}} = 0,5914 \text{ нм}^3$. Общее число

атомов Fe (N_{Fe}) на одну ячейку равно 24. Таким образом, среднее число атомов Fe на одну НЧ ($N_{Fe/НЧ}$) можно рассчитать как $N_{Fe/НЧ} = \frac{V_{НЧ}}{V_{эя}} N_{Fe}$. Поверхностная доля атомов Fe ($\omega_{П}$) в первом приближении равна $\omega_{П} = 100 \cdot 4 \cdot N_{Fe/НЧ}^{-1/3}$. Исходя из этого, около 6% атомов Fe находятся на поверхности НЧ размером 25 нм. Поскольку каждый 3й атом железа имеет конфигурацию Fe^{2+} , первый слой атомов Fe на поверхности НЧ, таким образом, полностью окислен до Fe^{3+} , в то время как остальная часть представляет собой стехиометричный магнетит Fe_3O_4 .

Таким образом, в результате изучения структуры и магнитных характеристик НЧ магнетит-золото было установлено, что при комнатной температуре НЧ $Fe_3O_4@Au$ являются суперпарамагнитными, и их свойства соответствуют переходному состоянию между Fe_3O_4 и $\gamma\text{-}Fe_2O_3$. Кроме того, содержание Fe_3O_4 в структуре «ядро-оболочка» низкое и составляет менее 10% от массы всей НЧ, что ограничивает диапазон достижимых концентраций Fe_3O_4 в растворе. Доступной для дальнейшей функционализации является только золотая оболочка на поверхности НЧ. На основании полученных данных наиболее перспективным для рассмотрения применением НЧ $Fe_3O_4@Au$ было выбрано исследование характеристик образцов в *in vitro* МРТ, а также магнито-механическом управлении активностью ферментов, которые можно иммобилизовать на поверхности НЧ за счет ковалентной связи с золотой оболочкой.

В свою очередь, структура и магнитные свойства НЧ $Fe_3O_4\text{-}Au$ были впервые систематически исследованы и оптимизированы в широком диапазоне размеров оксида железа (6 – 44 нм), в результате чего удалось добиться значительных вариаций в характеристиках НЧ. При комнатной температуре были получены как суперпарамагнитные НЧ (образцы 5 и 6), так и ферритмагнитные (образцы 7 и 8). При этом с увеличением размера НЧ их свойства изменялись от переходных между Fe_3O_4 и $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ до выраженных характеристик стехиометричного Fe_3O_4 . К их числу относятся намагниченность насыщения объемного материала и высокая эффективная анизотропия октаэдрических НЧ, находящихся на границе ферритмагнитного и суперпарамагнитного состояния (образец 7). Это дает основание полагать, что перспективным будет исследование свойств образцов в *in vitro* МРТ и ГМЧ как функции размера НЧ. Кроме того, «двойная» химическая функциональность НЧ $Fe_3O_4\text{-}Au$ с учетом возможности селективной модификации поверхностей Fe_3O_4 и Au является актуальной для дальнейшего рассмотрения в тераностике и мультимодальной визуализации.

Для всех вышеперечисленных применений необходимы стабильные, нетоксичные НЧ, функционализированные органическими лигандами. Таким образом, следующим этапом является исследование и оптимизация химических свойств НЧ.

3.3 Оптимизация химических свойств наночастиц магнетит-золото для биомедицинских применений

3.3.1 Функционализация поверхности наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$

Как уже упоминалось ранее, в НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ доступной для химической модификации является только поверхность золотой оболочки. Одним из наиболее перспективных вариантов ее функционализации является использование тиол-содержащих соединений, образующих прочную связь «сера-золото» (с энергией 40 ккал/моль). Кроме того, имея в виду дальнейшую модификацию НЧ ферментом для изучения магнито-механической регуляции его активности, в работе варьировали длину углеводородной цепи лиганда.

Таким образом, НЧ были покрыты L-цистеином, 3-меркаптопропионовой кислотой (3-МПК), липоевой кислотой, 11-меркаптоундекановой кислотой (11-МУК) и тиол-ПЭГ-кислотой, структурные формулы которых изображены на рисунке 15. При этом тиольная или дисульфидная группировка лиганда реагировала с поверхностью НЧ, образуя связь Au-S и вытесняя цитрат-ионы, электростатически связанные с поверхностью НЧ после их получения, а карбоксильная группа лиганда была обращена в раствор. Маркировка образцов НЧ, а также их гидродинамический диаметр D_{HD} и ζ -потенциал, определенные методом DLS, приведены в таблице 12.

Таблица 12. Маркировка и физико-химические характеристики образцов функционализированных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, полученных в работе

Маркировка	Образец $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	Лиганд	D_{HD} , нм	ζ -потенциал, мВ
Образец 1А	Образец 1А	-	70 ± 38	-37 ± 4
Образец 1Б	Образец 1Б	-	51 ± 21	-48 ± 4
М-1	Образец 1А	L-цистеин	93 ± 34	-9 ± 2
М-2	Образец 1А	3-МПК	69 ± 33	-19 ± 3
М-3	Образец 1А	Липоевая кислота	65 ± 33	-25 ± 3
М-4	Образец 1А	11-МУК	65 ± 25	-20 ± 3
М-5	Образец 1А	Тиол-ПЭГ-кислота	70 ± 35	-18 ± 4
М-6	Образец 1Б	Тиол-ПЭГ-кислота	74 ± 30	-39 ± 3

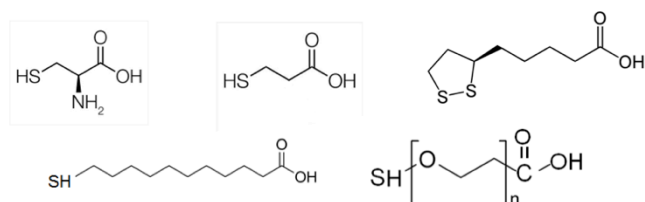


Рисунок 15. Лиганды, использовавшиеся для функционализации НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (слева направо): L-цистеин, 3-МПК, липоевая кислота, 11-МУК, тиол-ПЭГ-кислота

Размер частиц, определенный методом DLS, после функционализации достоверно не изменялся по сравнению с исходным в образцах 1А и 1Б (табл. 12). Вероятно, играют роль два параллельных процесса – уменьшение агрегации НЧ в растворе вследствие стабилизации лигандом и одновременный рост их гидродинамического радиуса. ζ -потенциал всех НЧ был отрицательным, что до функционализации можно объяснить наличием цитрат-ионов на поверхности золота, обеспечивающих его стабилизацию. После покрытия НЧ серосодержащими лигандами и диализа отрицательный ζ -потенциал объясняется зарядом карбоксильных групп лигандов и пропорционален их количеству. Таким образом, можно сделать вывод, что во всех случаях функционализация прошла успешно; предположительно, в образце М-6 было максимальное количество связанного лиганда вследствие наибольшего среди всех образцов по модулю ζ -потенциала (-39 мВ). Все образцы НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ обладали выраженным пиком ППП в видимом диапазоне. На рисунке 16 в качестве примера приведены спектры для образцов М-5 и М-6. Полученные коллоидные растворы НЧ были стабильны во времени – так, после трех недель при $+4^\circ\text{C}$, оптическая плотность растворов в максимуме поглощения (526-538 нм) составляла 98 – 102% от исходной.

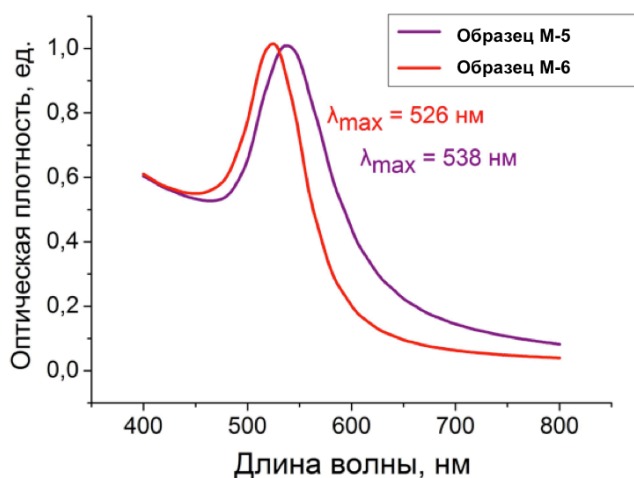


Рисунок 16. Спектроскопия поглощения в видимом диапазоне для образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в диапазоне 400 – 800 нм (образцы М-5 и М-6); указано положение максимума ППП

3.3.2 Функционализация поверхности наночастиц Fe₃O₄-Au

Для исследования характеристик в МРТ и ГМЧ, НЧ Fe₃O₄-Au были переведены в водную фазу путем покрытия биосовместимым полимером 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолмин-N- [карбокси (полиэтиленгликолем) -5000] (DSPE-ПЭГ-COOH), которое представляет собой производное полиэтиленгликоля и фосфолипида, широко используемое в создании наноконтейнеров для доставки лекарств (рис. 17, А) [200,201]. При этом его гидрофобная часть (DSPE) взаимодействовала с гидрофобными лигандами на поверхности НЧ (остатками олеиновой кислоты/ олеиламина), в то время как гидрофильные участки полимера (ПЭГ-COOH) располагались снаружи, обеспечивая эффективную стабилизацию НЧ в водной фазе. Иными словами, в растворе образовывались мицеллы, содержащие во внутренней полости НЧ.

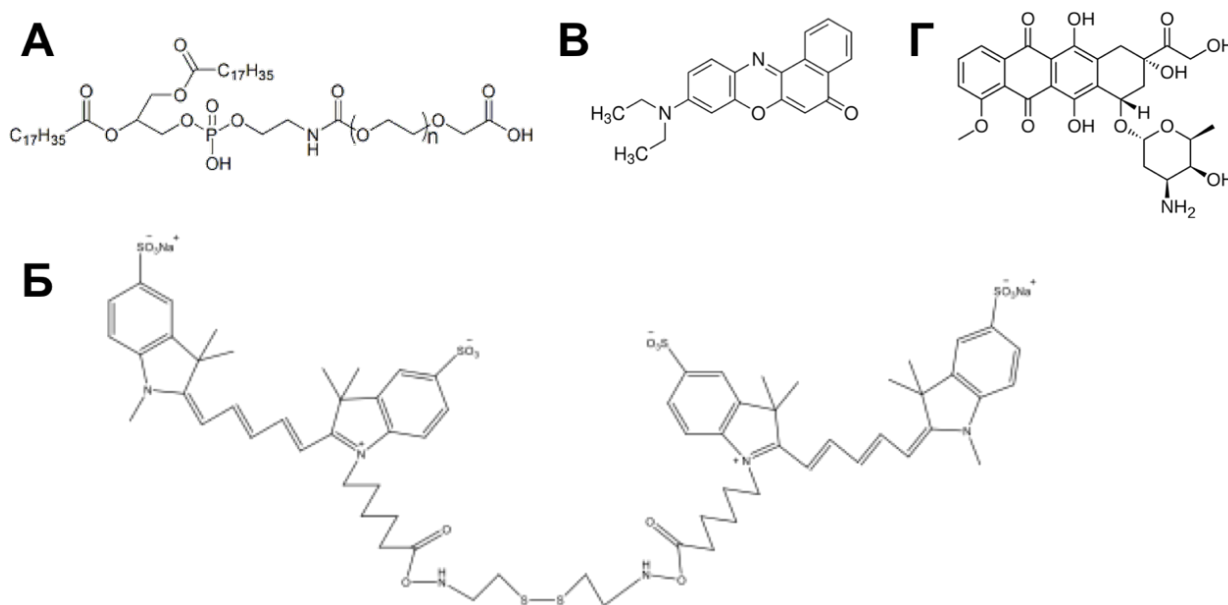


Рисунок 17. Лиганды, использовавшиеся для функционализации НЧ Fe₃O₄-Au : А) DSPE-ПЭГ-COOH; Б) производное красителя Sulfo-Cy5 с S-S фрагментом; В) краситель Nile Red; Г) противоопухолевый препарат DOX

По данным DLS, полученные НЧ с полимерной оболочкой обладали D_{HD} от 120 до 250 нм (табл. 13), что превышало размер НЧ по данным ПЭМ, который составлял не более 50 нм (табл. 5). Несмотря на то, что одной из причин этого является именно наличие полимера, а также адсорбированных ионов на поверхности НЧ, можно сделать вывод, что внутри мицелл из DSPE-ПЭГ-COOH могло находиться более одной НЧ Fe₃O₄-Au. Важно отметить, что согласно литературным данным (см. раздел 1.3), контролируемая агрегация магнитных НЧ может повысить значения как R_2 -релаксивности в МРТ, так и SLP в ГМЧ,

при этом D_{HD} полученных НЧ/ агрегатов является подходящим для доставки в опухоль [69]. За счет наличия карбоксильных групп на поверхности НЧ, все образцы обладали отрицательным ζ -потенциалом = (-20) – (-30) мВ.

Таблица 13. Физико-химические характеристики НЧ Fe_3O_4 -Au, стабилизированных DSPE-ПЭГ-COOH

Образец	D_{HD} , нм	ζ -потенциал, мВ
5-PEG	95 ± 2	-21 ± 3
6-PEG	112 ± 3	-23 ± 3
7-PEG	121 ± 5	-19 ± 3
8-PEG	160 ± 9	-28 ± 4

3.3.3 Функционализация поверхности наночастиц Fe_3O_4 -Au лигандами с различной природой химической связи

Для разработки методики так называемой «двойной» функционализации НЧ Fe_3O_4 -Au ковалентно связанной с поверхностью Au меткой, а также нековалентной загрузки лекарства или его флуоресцентной модели в полимерную оболочку на НЧ Fe_3O_4 , с целью дальнейшего применения в тераностике и/ или мультимодальной визуализации был выбран образец 7, стабилизированный DSPE-ПЭГ-COOH (далее – НЧ-PEG). Общая концепция и схема функционализации представлена на рисунке 18 [202].

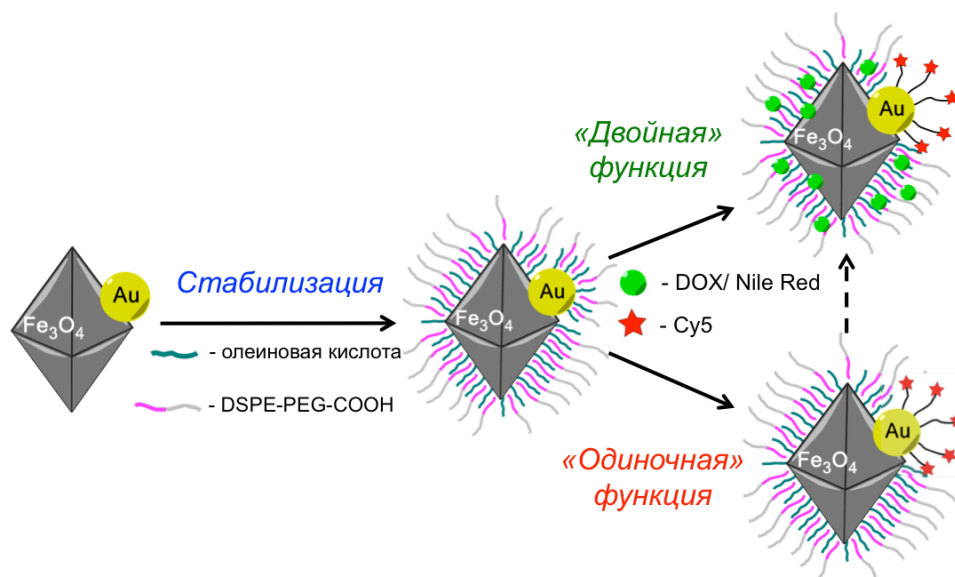


Рисунок 18. Схематичное изображение стабилизации НЧ Fe_3O_4 -Au при помощи DSPE-ПЭГ-COOH, а также «одиночной» функционализации НЧ Au производным Cy5 и «двойной» – при загрузке DOX/ Nile Red в полимерную оболочку на НЧ Fe_3O_4

Первым этапом была так называемая «одионочная» функционализация, основанная на присоединении флуоресцентного красителя Sulfo-Cy5, содержащего S-S фрагмент (рис. 17, Б), к поверхности НЧ Au с образованием ковалентной связи Au-S и вытеснением олеиновой кислоты, а также связанного с НЧ Au полимера. НЧ Fe₃O₄ в это время по-прежнему были покрыты DSPE-ПЭГ-COOH и служили для общей стабилизации системы (НЧ-Cy5). При этом D_{HD} и ζ-потенциал НЧ-Cy5 достоверно не изменялись по сравнению с соответствующими значениями для НЧ-PEG (125 ± 7 нм и -20 ± 5 мВ, соответственно), что можно объяснить относительно низким количеством Cy5 на поверхности НЧ, определенным по поглощению раствора при помощи калибровочного графика (33 мкг Cy5 на 1000 мкг Fe₃O₄/154 мкг Au).

«Двойная» функционализация включала в себя, помимо связывания с НЧ Au производного Cy5, нековалентную загрузку второго флуоресцентного красителя нильского красного Nile Red (NRed-НЧ-Cy5) или противоопухолевого препарата доксорубина DOX (DOX-НЧ-Cy5) в полимерную оболочку на НЧ Fe₃O₄. Как DOX, так и Nile Red за счет наличия гидрофобных участков (рис. 17, В и Г) взаимодействовали с фосфолипидной частью DSPE-ПЭГ-COOH, обеспечивая загрузку на уровне 86 мкг Nile Red и 285 мкг DOX на 1000 мкг Fe₃O₄ (также определяли по поглощению раствора). В обоих случаях D_{HD} НЧ увеличивался, оставаясь при этом менее 200 нм (172 ± 15 нм для NRed-НЧ-Cy5, 198 ± 19 нм для DOX-НЧ-Cy5). ζ-потенциал NRed-НЧ-Cy5 по-прежнему был отрицателен (-25 ± 5 мВ) вследствие гидрофобности Nile Red, «скрытого» в полимерной оболочке. Напротив, ζ-потенциал DOX-НЧ-Cy5 менял знак (+22 ± 5 мВ) вследствие положительного заряда DOX в водном растворе.

Эффективность конъюгации с НЧ-Cy5 красителя (в случае NRed-НЧ-Cy5) и лекарства (в случае DOX-НЧ-Cy5) оценивалась с помощью спектроскопии поглощения в видимом диапазоне (рис. 19). Для всех флуоресцентно меченых НЧ наблюдался характерный пик поглощения Cy5 (≈ 640 нм, рис. 19, А) с появлением пика Nile Red (≈ 539 нм) и DOX (≈ 480 нм) для NRed-НЧ-Cy5 и DOX-НЧ-Cy5, соответственно (рис. 19, Б). Отсутствие несвязанных красителей на НЧ после их очистки (центрифугирование в сочетании с фильтрацией и диализом) подтверждалось величиной поглощения супернатанта, которое не превышало уровня фона.

Для демонстрации того, что Cy5 действительно селективно связывается с поверхностью золота, а DOX – заходит в полимерную оболочку только на поверхности магнетита, был проведен ряд контрольных экспериментов с отдельными НЧ Au (диаметром 9 нм, использовавшимся для получения для получения структур типа «гантель») и НЧ Fe₃O₄ (образец 4), также стабилизированными при помощи DSPE-ПЭГ-

COOH (Au-PEG и Fe₃O₄-PEG, соответственно). К обоим типам НЧ добавляли Cy5 и DOX по протоколу, разработанному для НЧ Fe₃O₄-Au, и сравнивали спектры поглощения (рис. 19, В). В результате повышенный по сравнению с контролем сигнал на длинах волн 450-500 нм, соответствующий поглощению DOX, наблюдался только для DOX-НЧ-Cy5 и Fe₃O₄-PEG, тогда как пик на 635-650 нм, соответствующий поглощению Cy5, был обнаружен только для DOX-NP-Cy5 и Au-PEG. Таким образом, предположения о вытеснении олеиновой кислоты, а также связанного с НЧ Au полимера при присоединении Cy5 с образованием ковалентной связи Au-S, а также селективная загрузка DOX в оболочку на НЧ Fe₃O₄ подтвердились

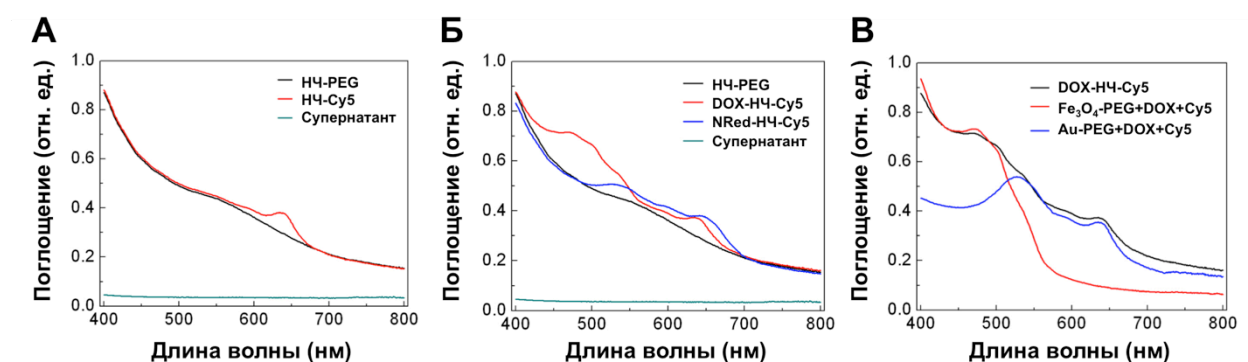


Рисунок 19. Спектроскопия поглощения в видимом диапазоне для НЧ Fe₃O₄-Au, функционализированных различными лигандами. А) Появление пика на ≈ 640 нм для НЧ-Cy5; Б) Появление пиков Nile Red (≈ 539 нм) и DOX (≈ 480 нм) для NRed-НЧ-Cy5 и DOX-НЧ-Cy5; В) результаты контрольных экспериментов с Fe₃O₄-PEG и Au-PEG, демонстрирующих селективность функционализации Nile Red/ DOX и Cy5, соответственно

3.3.4 Исследование токсичности наночастиц

Важным этапом тестирования НЧ для биомедицинских применений является доказательство их биосовместимости *in vitro*. В первую очередь, ее исследовали с помощью MTS-теста на клеточной культуре аденокарциномы молочной железы мыши 4T1. На рисунке 20, А показаны результаты MTS-теста для НЧ Fe₃O₄@Au, диспергированных в 1xPBS, в сравнении с НЧ Fe₃O₄ (образцы 1, М-5 и М-6) в достижимом диапазоне концентраций 0,075 – 1,5 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, а на рисунке 20, Б – для НЧ Fe₃O₄-Au, диспергированных в 1xPBS (образцы 5 – 8) в диапазоне 9 – 227 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄. Все исследуемые НЧ не оказывали токсического влияния на клетки, при этом образцы достоверно не отличались друг от друга, и во всех случаях уровень выживаемости клеток составляет более 90% по сравнению с контролем (PBS).

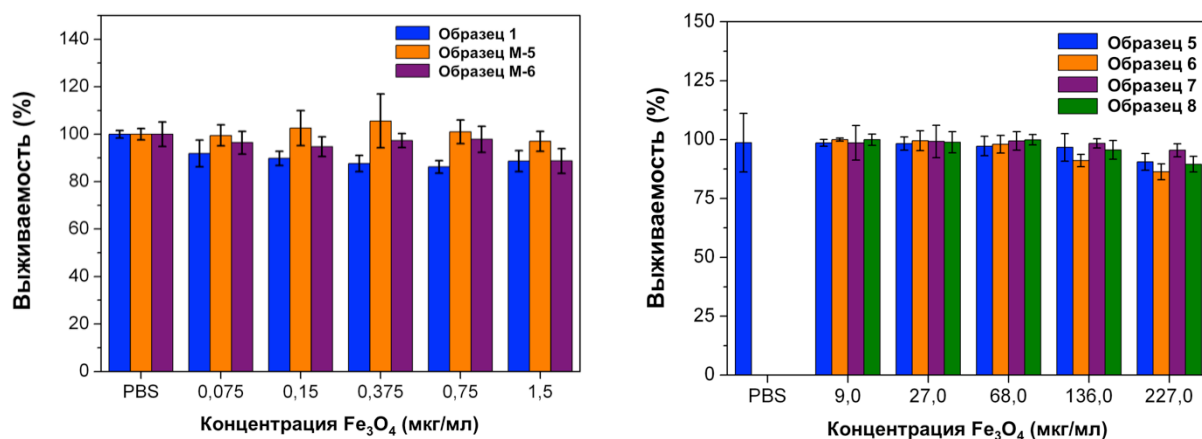


Рисунок 20. Выживаемость клеток 4Т1 после инкубации с (А) НЧ Fe₃O₄ и НЧ Fe₃O₄@Au (образцы 1, М-5 и М-6) и (Б) НЧ Fe₃O₄-Au (образцы 5 – 8) в течение 48 ч согласно результатам MTS-теста. Показаны средние величины ± стандартное отклонение (SD).

Кроме того, проводился сравнительный MTS-тест для НЧ-PEG и НЧ-Cy5 (рис. 21). В исследуемом широком диапазоне концентраций (8 – 193 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄) статистических различий между токсичностью образцов обнаружено не было, выживаемость клеток составляла более 90% по сравнению с контролем (PBS).

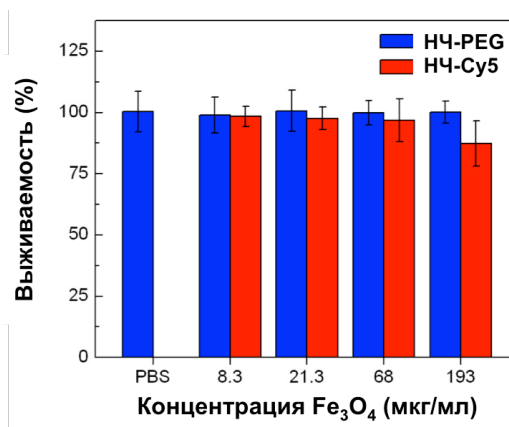


Рисунок 21. Выживаемость клеток 4Т1 после инкубации с НЧ-PEG и НЧ-Cy5 (в течение 48 ч (MTS-тест). Результаты показаны как средние величины ± SD

3.3.5 Исследование стабильности наночастиц

Неотъемлемой стадией тестирования НЧ Fe₃O₄-Au для дальнейших биомедицинских исследований является проверка их стабильности в различных физиологических средах с течением времени. На рисунке 22, А и Б, показано, что при 25°C D_{HD} и индекс полидисперсности (PDI) НЧ-PEG в DI H₂O и 1xPBS (концентрация

333 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄ и 51 мкг·мл⁻¹ Au) сохраняются, по меньшей мере, в течение 2 недель. Кроме того, при 37°C D_{HD} и PDI НЧ-PEG в культуральной среде RPMI с добавлением и без добавления фетальной бычьей сыворотки (FBS) остаются на уровне исходных величин в течение 2 дней, что является достаточным для проведения последующих *in vitro* / *in vivo* экспериментов. Аналогичная стабильность наблюдается и для НЧ-Су5 (рис. 22, В и Г).

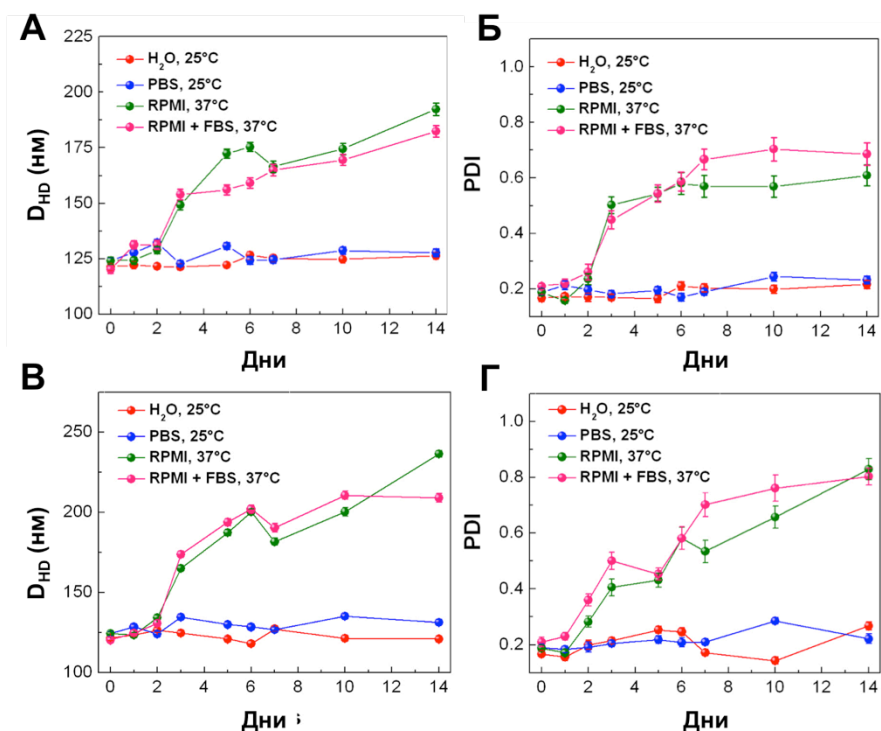


Рисунок 22. Стабильность НЧ-PEG (А-Б) и НЧ-Су5 (В-Г) в концентрации 333 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 51 мкг·мл⁻¹ Au в DI H₂O, 1xPBS, RPMI и RPMI с 10% FBS при 25°C и 37 °C (DLS): D_{HD} (А, В) и PDI (Б, Г) как функция времени; показаны средние величины ± SD

Таким образом, в данной части работы были исследованы химические свойства НЧ магнетит-золото с целью дальнейших биомедицинских исследований в МРТ, ГМЧ и т.д. НЧ Fe₃O₄@Au были ковалентно функционализированы серосодержащими карбоксильными лигандами с различной длиной углеводородной цепи, которые в дальнейшем могут быть использованы для ковалентной сшивки НЧ с молекулами фермента. НЧ Fe₃O₄-Au были переведены в водную фазу путем покрытия DSPE-ПЭГ-COOH. Все образцы НЧ нетоксичны для клеточной культуры 4T1. Свойства НЧ Fe₃O₄-Au были оптимизированы путем «одиночной» и «двойной» функционализации с введением на поверхность НЧ Au ковалентно связанной метки Су5 и нековалентной загрузки DOX/ Nile Red в полимерную оболочку на НЧ Fe₃O₄. Данная система перспективна для мультимодальной диагностики, а также визуализации процесса доставки препаратов *in vitro* и *in vivo*.

3.4 Функциональные свойства наночастиц магнетит-золото в магнитно-резонансной томографии и магнитной гипертермии

3.4.1 Определение характеристик наночастиц в магнитно-резонансной томографии

Исходя из полученных физических свойств НЧ (раздел 3.2), следующим этапом работы являлось определение их контрастирующей способности в МРТ на так называемых фантомных изображениях водных растворов. Она оценивалась путем измерения зависимости обратного времени T_2 -релаксации от концентрации Fe, после чего полученную зависимость аппроксимировали линейной функцией и вычисляли тангенс угла наклона, соответствующий R_2 -релаксивности.

Для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ исследовали образцы М-5 и М-6 (соответствуют образцам 1А и 1Б, покрытым тиол-ПЭГ-кислотой с идентичным размером магнитного ядра и различной толщиной золота на поверхности, см. табл. 12). Полученные значения R_2 также сравнивали с величинами для НЧ Fe_3O_4 до покрытия золотом (образец 1).

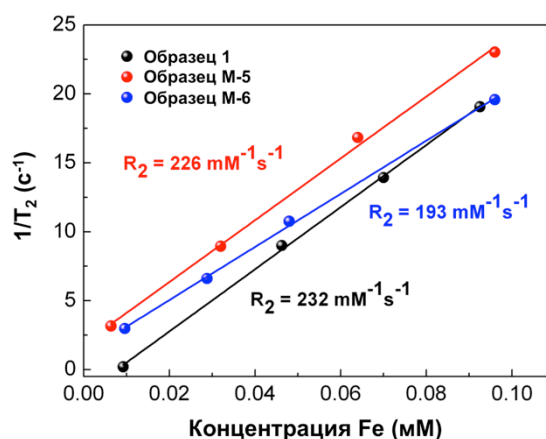


Рисунок 23. Зависимость обратного времени T_2 -релаксации протонов воды от концентрации железа для НЧ Fe_3O_4 и $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (образцы 1, М-5 и М-6) в воде. Значение R_2 -релаксивности соответствует тангенсу угла наклона при линейной аппроксимации.

Было установлено, что исследованные образцы существенно уменьшают время T_2 -релаксации протонов воды; ослабление сигнала коррелирует с концентрацией частиц в растворе (рис. 23). Для образцов 1, 1А и 1Б были получены величины R_2 -релаксивности 232, 226 и 193 $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, соответственно, что превышает аналогичные величины существующих коммерческих контрастных агентов на основе НЧ оксидов железа, таких как Resovist® ($R_2 = 150 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [203]) и Feridex® ($R_2 = 120 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [204]). Можно сделать

вывод, что покрытие золотой оболочкой не приводит к существенному влиянию на способность НЧ Fe_3O_4 уменьшать время T_2 -релаксации протонов воды за счет создания вокруг себя неоднородного МП, что коррелирует также с отсутствием влияния золотой оболочки на параметры петли гистерезиса (см. раздел 3.2.2). Поскольку зависимость $1/T_2$ от концентрации железа линейная с коэффициентом корреляции $> 0,995$, это значит, что образцы не агрегируют под действием поля.

МРТ-исследования НЧ Fe_3O_4 -Au с целью определения зависимости R_2 от размера НЧ (образцы 5, 6, 7 и 8, стабилизированные DSPE-ПЭГ-COOH) проводились не только для водных растворов, но также и в 2% агарозе. Выбор агарозы в качестве дополнительной среды для измерений обусловлен тем, что она имеет вязкость, близкую к цитоплазме клеток, имитируя, таким образом, микроструктуру последних [137,205]. Как полисахаридная матрица, агароза широко распространена для использования в качестве модельных систем, поскольку в зависимости от концентрации она может имитировать как мягкие, так и жесткие ткани [206,207].

Для НЧ Fe_3O_4 -Au (рис. 24) в данной работе был обнаружен рост R_2 -релаксивности от 159 до 495 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (в воде, рис. 24, А) и от 118 до 612 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (в агарозе, рис. 24, Б) в ряду образцов 5 – 7 с диаметром НЧ Fe_3O_4 от 6 до 25 нм, соответственно. Дальнейшее его увеличение до 44 нм в образце 8 не привело к значительному повышению значения R_2 (514 и 620 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ для НЧ в воде и агарозе, соответственно). Данный факт можно объяснить начальным ростом намагниченности насыщения M_s при увеличении НЧ Fe_3O_4 вплоть до размера 25 нм, при котором достигается значение M_s объемного материала, сохраняющееся и для НЧ диаметром 44 нм. Таким образом, процесс T_2 -релаксации образцов 5 и 6 может быть описан в терминах MAR, рост НЧ до 25 нм в образце 7 приводит к промежуточному состоянию, близкому к режиму SDR, тогда как поведение образца 8 уже полностью отвечает режиму SDR.

Следует отметить, что величина R_2 -релаксивности для образцов 7 и 8 выше по сравнению с гантелевидными НЧ Fe_3O_4 -Au, ранее описанными в литературе ($R_2 = 245 - 381 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [163,208], а также по сравнению с коммерческими контрастными агентами. Наиболее вероятной причиной исключительной контрастирующей способности НЧ является высокая упорядоченность кристаллической структуры, которая приводит к магнитным свойствам объемного материала, создающему сильное МП [107]. В дополнение к этому, ограненные НЧ создают вокруг себя высокие градиенты МП ΔB , особенно в окрестности 6 вершин и 8 ребер октаэдров. Согласно теории МРТ, дополнительный градиент ΔB приводит к ускорению поперечной релаксации спинов протонов, выражаемой зависимостью $1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta B/2$, где T_2^* – сокращенное время

поперечной релаксации, T_2 – время поперечной релаксации в однородном МП, $\gamma = 2,67 \cdot 10^8 \text{ рад} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{Тл}^{-1}$ – гиромагнитное отношение протонов воды. Эти данные коррелируют с максимальными значениями R_2 -релаксивности в литературе ($761 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для кубических НЧ Fe_3O_4 диагональю 22 нм [115] и $679 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для октаполюсов [116]). Таким образом, улучшенные значения R_2 -релаксивности по сравнению с коммерческими контрастными агентами на основе сферических НЧ достигаются для гибридных структур Fe_3O_4 -Au вследствие ограниченности последних.

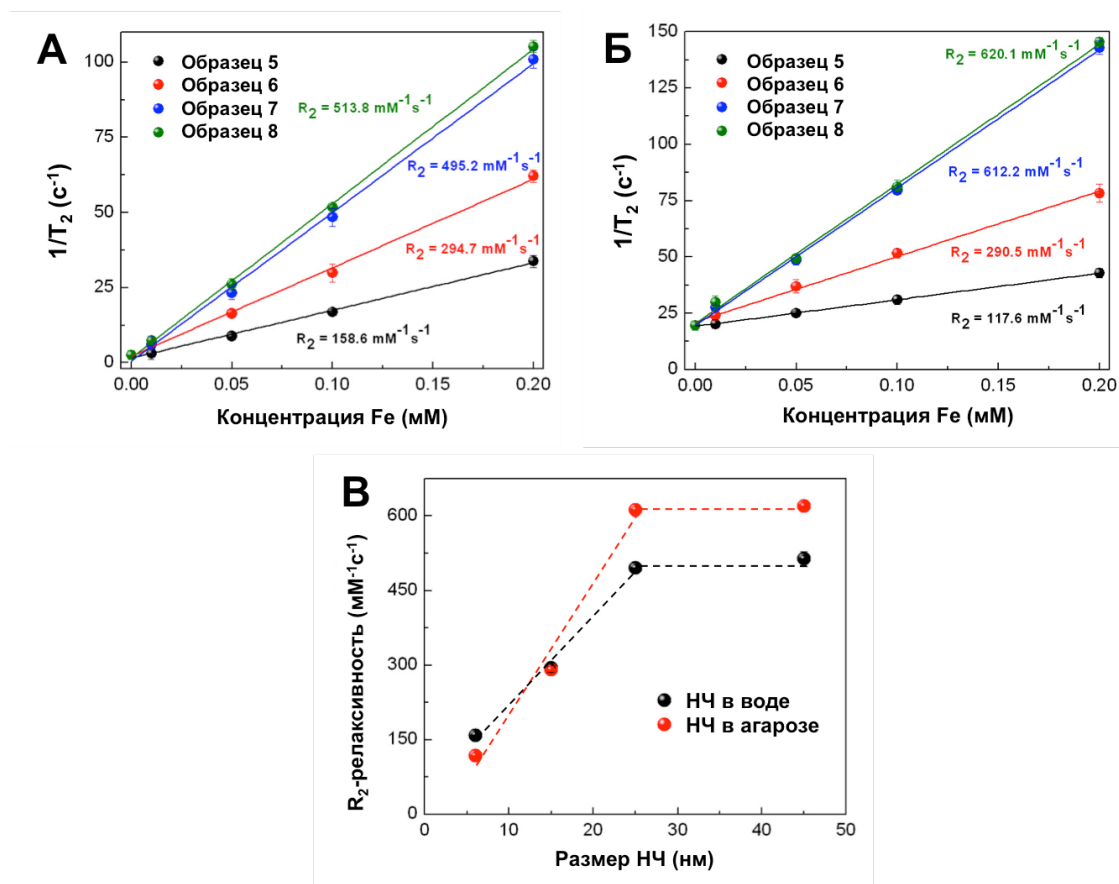


Рисунок 24. Функциональные свойства НЧ Fe_3O_4 -Au в МРТ. Зависимость обратного времени T_2 -релаксации протонов воды от концентрации железа для образцов 5 – 8 в воде (А) и 2% агарозе (Б). Значение R_2 -релаксивности соответствует тангенсу угла наклона при линейной аппроксимации. Зависимость R_2 -релаксивности от размера НЧ в воде и агарозе (В). Погрешности значений на графике меньше размера символа

Более того, значения R_2 становятся еще выше по сравнению с водными растворами, когда НЧ диспергированы в агарозе (рис. 24, В), за исключением образца 5, для которого величина релаксивности в агарозе ниже, чем в воде (соответствующие значения для образца 6 практически идентичны). В соответствии с описанной выше теорией процессов релаксации, НЧ диаметром до 20-25 нм находятся в режиме MAR, где лимитирующим

фактором выступают диффузионные процессы. Заключение НЧ в агарозную матрицу препятствует или, по крайней мере, замедляет диффузию молекул воды в окрестности НЧ и, следовательно, уменьшает значения R_2 -релаксивности. Несмотря на то, что одной из возможных причин высокой контрастирующей способности других образцов является дополнительная стабилизация НЧ, важно отметить, что во время измерений не наблюдалось агломерации или осаждения последних. Следовательно, можно ожидать эффективное МРТ-контрастирование с помощью НЧ Fe_3O_4 -Au также и в *in vitro* / *in vivo* экспериментах.

3.4.2 Определение характеристик наночастиц в магнитной гипертермии

Для изучения тепловыделительных характеристик в ГМЧ были выбраны НЧ Fe_3O_4 -Au, позволяющие достичь высоких концентраций Fe в растворе ($1-10 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Эффективность нагрева НЧ в модельных системах определялась в переменном МП частотой 765 кГц и амплитудой 30 мТл для образцов 5, 6, 7 и 8, стабилизированных DSPE-ПЭГ-СООН в различных концентрациях в воде и 2% агарозе (рис. 25).

На рисунке 25, А изображены две кривые нагрева (при включении МП) и охлаждения (при отключении МП) для водных растворов образцов 5 и 7, соответственно. Очевидно, что существует критический размер НЧ Fe_3O_4 , который делает структуры Fe_3O_4 -Au пригодными для применения в ГМЧ. Суперпарамагнитные НЧ Fe_3O_4 диаметром 6 нм (образец 5) не вызывали нагрев до рабочих температур ГМЧ, составляющих 41-45°C (заштрихованная полоса на рисунке). В то же время, ферримагнитные НЧ Fe_3O_4 размером 25 нм достигали 42 °C в течение первых 35 с приложения МП. Аналогичные кривые для соответствующих образцов НЧ, диспергированных в агарозе, показаны рисунке 25, Б.

Из начальных скоростей нагрева $\Delta T/\Delta t$ по формуле (5) определялась удельная мощность тепловыделения (SLP) для всех образцов НЧ Fe_3O_4 -Au в агарозе и образца 7 в воде, выбранного в качестве эталона. Результаты приведены в таблице 14. Для образцов 5 и 6 были получены низкие (менее $80 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$) значения SLP, что недостаточно для эффективной ГМЧ; однако, SLP образцов 7 и 8 значительно выше (более $327 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$, рис. 25, В и Г).

Как и в случае с релаксивностью, наблюдаемая зависимость может быть объяснена переходом от суперпарамагнитного к ферримагнитному состоянию в диапазоне размеров 15 – 25 нм, сопровождающемуся ростом намагниченности насыщения M_s с увеличением диаметра НЧ [18]. Ниже температуры блокировки T_b функциональность образцов дополнительно повышается за счет Неелевских потерь, увеличивающих SLP.

Таблица 14. Скорости нагрева $\Delta T/\Delta t$ и рассчитанные значения SLP для различных концентраций НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (образцы 5 – 8) агарозе, а также образца 7 в воде

Образец	Среда	Скорость нагрева, $\text{K}\cdot\text{c}^{-1}$	$\text{C}(\text{Fe}_3\text{O}_4)$, $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$	$\text{C}(\text{Fe})$, $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$	SLP, $\text{Вт}\cdot\text{г}^{-1}\text{Fe}$
5	агароза	0,010	5,0	3,6	12 ± 1
6		0,070			81 ± 6
7		0,281			327 ± 24
8		0,342			398 ± 29
7	вода	0,531	5,0	3,6	617 ± 44

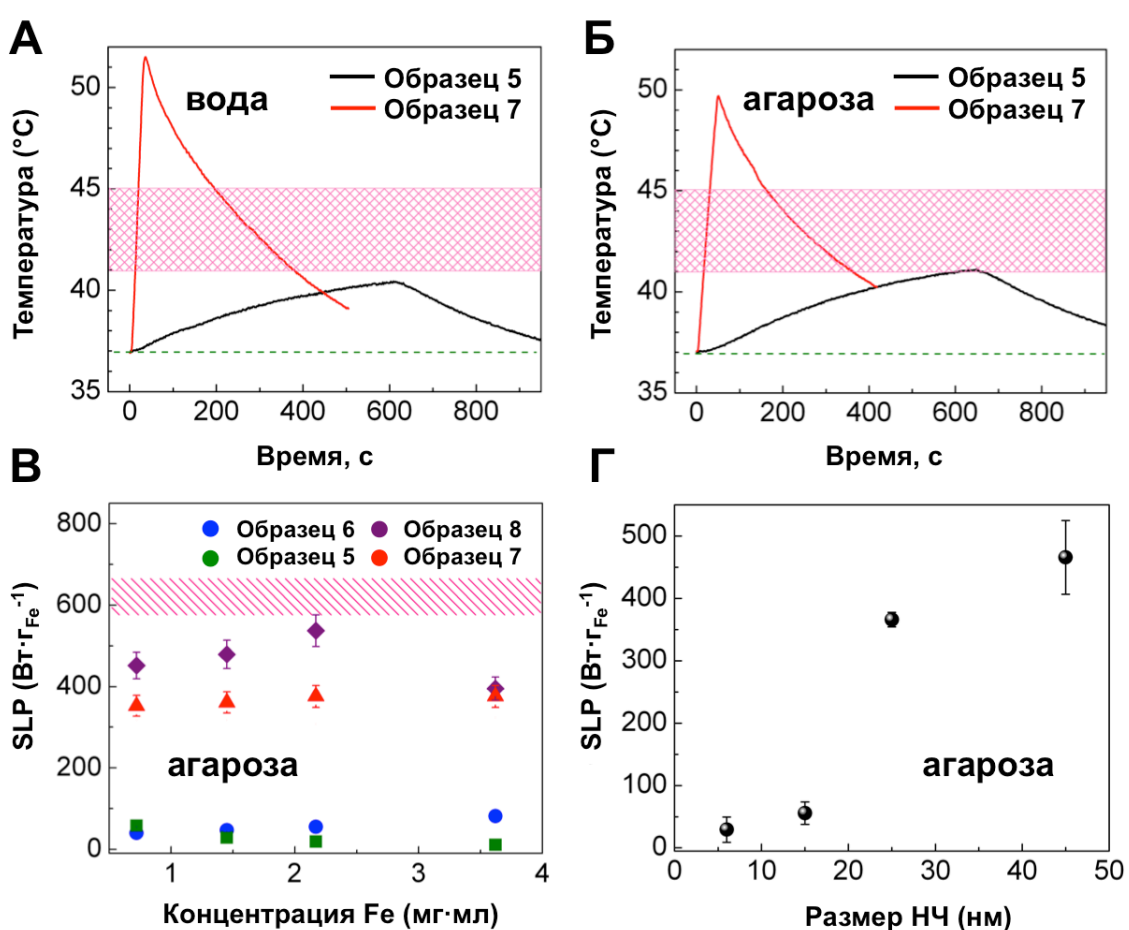


Рисунок 25. Результаты экспериментов по ГМЧ для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (765 кГц, 30 мТл). Кривые нагрева образцов 5 и 7 ($3,6 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1} \text{ Fe}$) в воде (А) и агарозе (Б), заштрихованные области показывают интервал температур 41–45 $^{\circ}\text{C}$; В) Значения SLP для различных концентраций образцов 5, 6, 7 и 8 в агарозе по сравнению в эталонным значением в воде для образца 7 ($3,6 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1} \text{ Fe}$), показанным заштрихованной областью; Г) сравнение усредненных по концентрациям значений SLP для НЧ различного размера. Погрешности значений на графиках (В) и (Г) соответствуют SD

В литературе по гипертермии для НЧ оксидов железа оптимальным принято считать именно диаметр 20-25 нм [70]. Вместе с этим, образец 8 диаметром 44 нм обладает бóльшим SLP по сравнению с образцом 7. Вероятно, это можно объяснить тем, что часть НЧ такого размера уже находится в многодоменном магнитном состоянии (и обладают более высокой T_B). Это означает, что создание, перемещение и аннигиляция доменных стенок в переменном МП может добавить дополнительный механизм потерь энергии. Однако в целом превалируют именно гистерезисные потери, за счет чего для образцов 7 и 8 значения SLP становятся идентичными в пределах погрешности при концентрации $3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}$ (рис. 25, В).

В качестве эталона скорость нагрева и соответствующая ей SLP измерялись для образца 7 в водном растворе ($3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}$), который далее использовался для экспериментов по ГМЧ *in vitro* (раздел 3.4.3). На рисунке 25, В SLP образца 7, равная $617 \pm 44 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$ обозначена заштрихованной полосой. Для каждого из образцов НЧ значения SLP усреднялись по всем концентрациям. На рисунке 25, Г представлена зависимость значения SLP от размера магнитной компоненты НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$. Резкое отличие в SLP между образцами 6 и 7 объясняется переходом от суперпарамагнитного состояния к термически заблокированному ферримагнитному (см. раздел 3.2.2).

Описываемые результаты находятся в хорошем согласии с соответствующей литературой по димерным НЧ на основе золота и оксидов железа ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ [140] и $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Au}$ [12]). В последней работе оптимальный нагрев в МП 300 кГц, 30 мТл достигается для НЧ размером $\sim 23 \text{ нм}$. Однако приведенные значения SLP (до $1330 \pm 20 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1} \text{ Fe}$), на наш взгляд, являются сильно завышенными. Это подтверждает кривая нагрева для концентрации Fe в диапазоне $6\text{-}12 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ в приложении к [12], дающая $\Delta T/\Delta t = 0,640 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$, что соответствует величине $\text{SLP} = 223 - 447 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$. Таким образом, гибридные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ диаметром 25 нм, полученные в настоящей работе, обеспечивают высокие значения SLP для магнитной гипертермии, находящиеся на уровне или превосходящие величины, указанные в [12]. В конечном итоге, для повышения эффективности нагрева в ГМЧ необходимы НЧ Fe_3O_4 с диаметром выше критического ($> 20 \text{ нм}$) в диапазоне концентраций $1\text{-}10 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Заключение НЧ в матрицу агарозы сохраняет те же величины SLP для образца 5 по сравнению с водными растворами, однако приводит к почти двукратному уменьшению SLP для образца 7, так как Брауновская релаксация, зависящая от вязкости среды, частично подавляется в агарозе (см. рис. 25, В и Г). Несмотря на это, в целом ферримагнитные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ обеспечивают высокие значения SLP для магнитной гипертермии как в воде, так и в агарозе (сопоставимой по вязкости с внутриклеточной средой), что важно для последующей трансляции результатов на эксперименты *in vitro*.

3.4.3 Магнитно-резонансная томография и магнитная гипертермия *in vitro*

Образец 7 НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ размером 25 нм, стабилизированный DSPE-ПЭГ- COOH (НЧ-PEG), продемонстрировал наилучшие контрастные и тепловыделительные характеристики при изучении на модельных системах в МРТ и ГМЧ, в связи с чем был выбран для дальнейшего изучения *in vitro*.

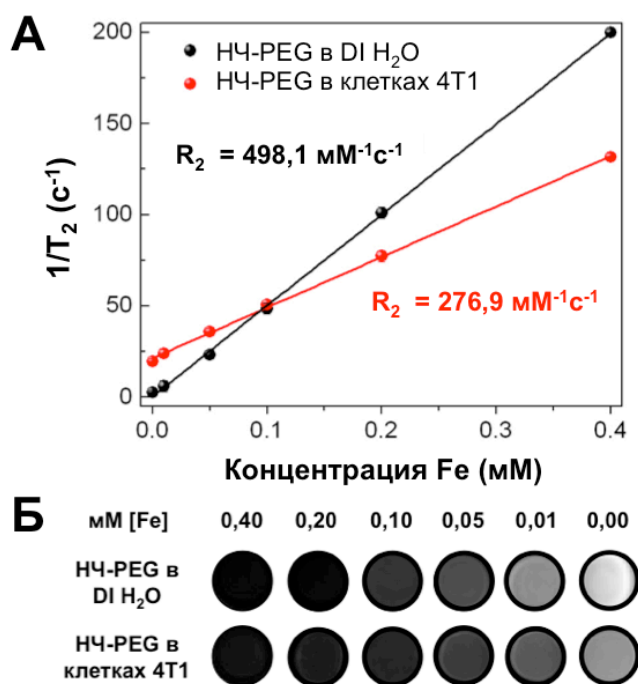


Рисунок 26. НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ как контрастные агенты в *in vitro* МРТ. А) Обратное время T_2 -релаксации протонов воды как функция концентрации Fe для НЧ-PEG в DI H₂O и клетках 4T1. Значение R_2 -релаксивности соответствует тангенсу угла наклона при линейной аппроксимации. Б) T_2 -взвешенные изображения ($TE = 24$ мс), соответствующие НЧ-PEG в концентрации 0 – 0,4 мМ Fe в DI H₂O (верхняя панель) и клетках 4T1 (нижняя панель).

На рисунке 26, А и Б представлены зависимости обратного времени T_2 -релаксации от концентрации Fe для НЧ-PEG в воде и клетках 4T1 (после инкубирования с ними в течение 48 ч и диспергирования клеток в агарозе), а также их МРТ-изображения. Путем линейной аппроксимации были получены величины R_2 -релаксивности = $498,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $276,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ для НЧ-PEG в воде и клетках 4T1, соответственно. Таким образом, контрастирующая способность НЧ в условиях *in vitro* несколько снижается, однако остается высокой по сравнению с аналогичными экспериментами с клеточными культурами, описанными в литературе, а также коммерческими контрастными агентами

[11,159,163,208]. Следует подчеркнуть, что все МРТ-исследования проводились в высокопольном сканере для лабораторных животных, преимуществами которого является высокое соотношение сигнал/шум и высокое пространственное разрешение для визуализации *in vivo*. При этом индукция использованного прибора (7 Тл, 298,06 МГц) намного выше, чем у большинства используемых клинических томографов (1,5 – 3 Тл, 63,87 – 127,74 МГц). Однако Смоленский и соавторы [112] показали, что R_2 -релаксивность НЧ оксидов оксида железа не зависит от напряженности МП в частотном диапазоне 20-500 МГц. Это означает, что результаты, полученные в описываемом МРТ-исследовании, также применимы для клинических низкопольных томографов.

Для изучения свойств НЧ-PEG в *in vitro* ГМЧ на клеточной культуре 4Т1, образец диспергировали в среде RPMI в концентрации $3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ Fe с сохранением исходного D_{HD} в воде (123 ± 7 нм) и добавляли к клеткам 4Т1. Образцы немедленно подвергали воздействию МП частотой 261-393 кГц и амплитудой 25 мТл, при этом частоту регулировали таким образом, чтобы поддерживать температуру постоянной в интервале $46 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 15 или 30 мин. Затем жизнеспособность клеток тестировали несколькими способами. В качестве первого метода был выбран MTS-тест (рис. 27). Кроме того, результаты были дополнены изучением активации апоптоза/некроза (рис. 28 и 30), а также генерации АФК (рис. 29). Известно, что избыточный уровень продуцирования АФК вызывает апоптоз [176,209,210]. Используемая комбинация методов позволяет сделать достоверные выводы о влиянии НЧ на жизнеспособность клеточной культуры в условиях ГМЧ [152].

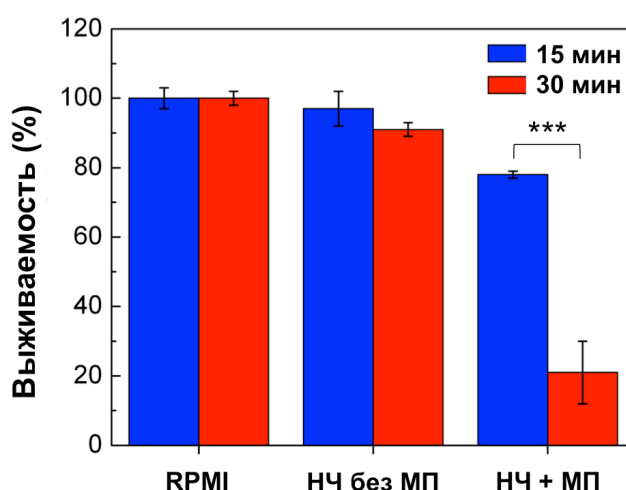


Рисунок 27. Выживаемость клеток 4Т1 (MTS-тест) после 15 и 30 мин инкубации при температуре 37°C в среде без НЧ (RPMI); при 37°C в присутствии НЧ-PEG ($3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ Fe) без МП (НЧ без МП); нагрев до $(46 \pm 1)^\circ\text{C}$ в присутствии НЧ-PEG в МП 393 кГц, 25 мТл (НЧ + МП) Результаты показаны как средние величины $\pm$ SD, *** $p < 0,001$ (ANOVA)

В ходе экспериментов воздействие МП в течение 15 мин не вызывало значительного снижения выживаемости в культуре 4Т1 (гибель $22 \pm 1\%$ клеток, MTS-тест) по сравнению с клетками, инкубированными при 37°C с или без НЧ в отсутствие МП. Данные MTS-теста подтверждались также исследованием апоптоза/ некроза: положительное окрашивание клеток 4Т1 с помощью этого набора обнаруживалось только на периферии клеточного монослоя. Кроме того, после 15 мин воздействия МП наблюдалась активация АФК, что было подтверждено увеличением числа H2DCFDA-положительных клеток в культуре. Важно, что 30 мин воздействия МП уже достаточно для гибели $79 \pm 8\%$ клеток (MTS-тест). В соответствии с этим обнаруживалась более выраженная активация апоптоза / некроза (рис. 28) и генерация АФК (рис. 29, А).

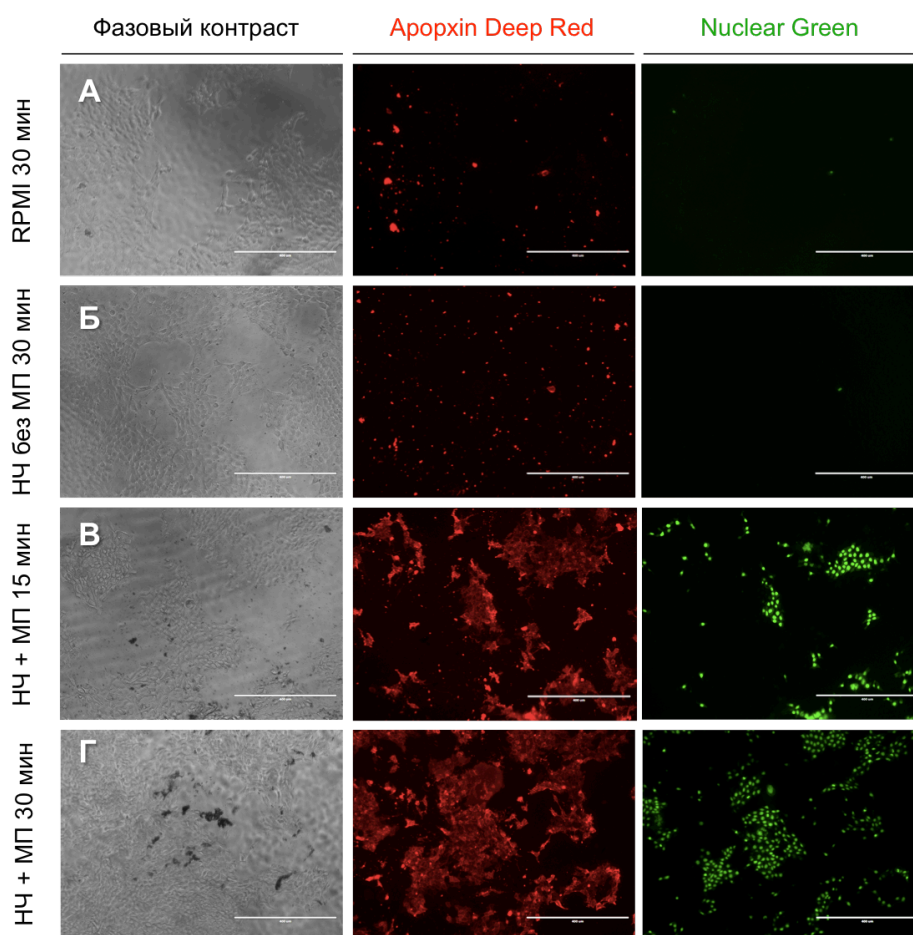


Рисунок 28. Активация апоптоза/ некроза в клетках 4Т1, культивируемых с НЧ-PEG ($3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}$), фазовый контраст (левый столбец) и флуоресцентная микроскопия, внутриклеточное окрашивание с помощью Apopxin Deep Red (средний столбец) и Nuclear Green (правый столбец). А) Контрольные клетки без НЧ; Б), инкубированные с НЧ при 37°C в нулевом МП; В) инкубированные с НЧ в МП = 261-339 кГц, 25 мТл ($(46 \pm 1)^\circ\text{C}$) в течение 15 мин; Г) инкубированные с НЧ в МП = 261-339 кГц, 25 мТл ($(46 \pm 1)^\circ\text{C}$) в течение 30 мин. Шкала соответствует 400 мкм

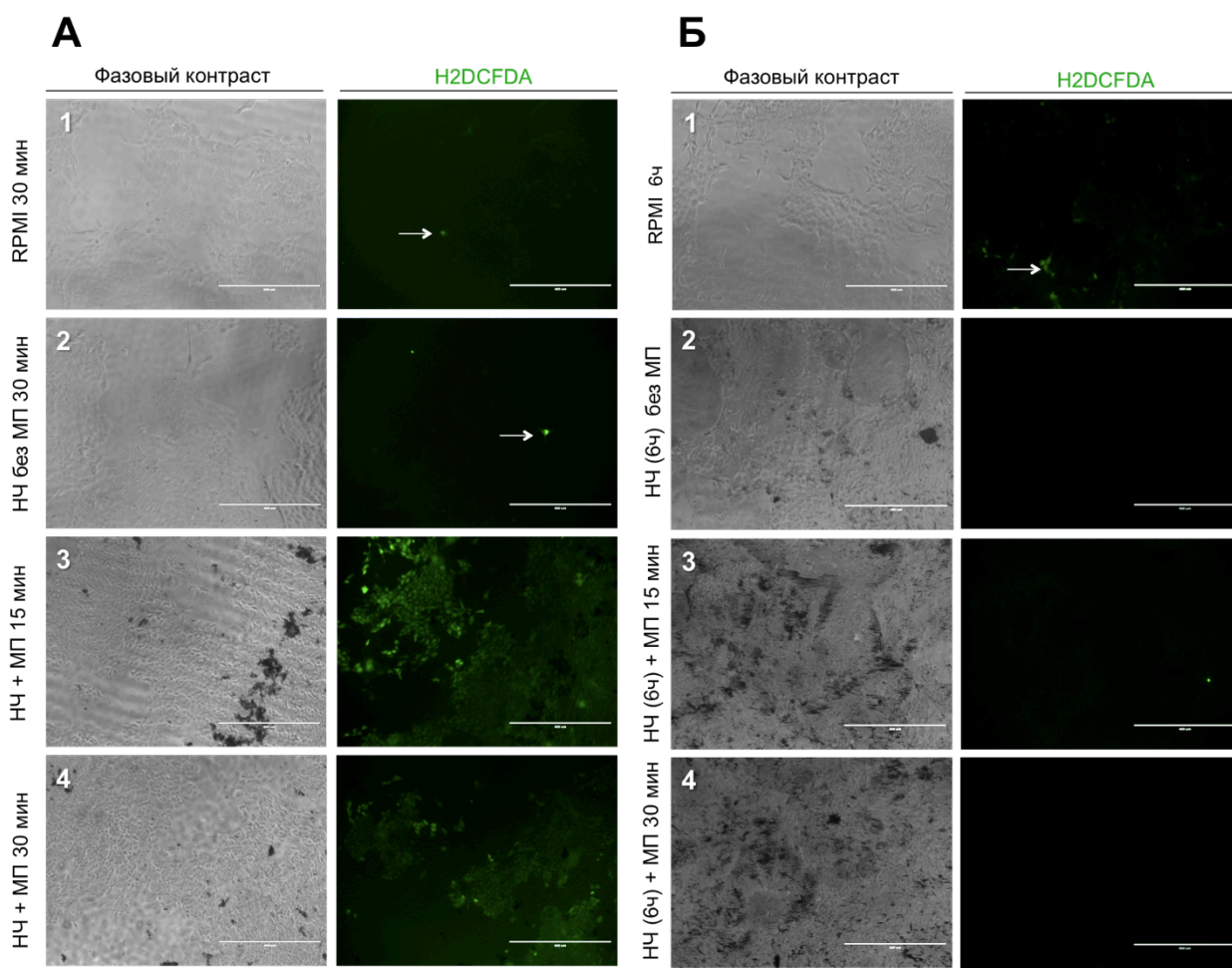


Рисунок 29. Генерация АФК в клетках 4Т1 при добавлении НЧ-PEG ($3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}$) непосредственно перед экспериментом (А) и предварительно культивированных с НЧ-PEG ($3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}$) в течение 6 ч (Б), фазовый контраст (левый столбец) и флуоресцентная микроскопия, внутриклеточное окрашивание с помощью Aporxin Deep Red (средний столбец) и Nuclear Green (правый столбец). 1) Контрольные клетки без НЧ; 2), инкубированные с НЧ при 37°C в нулевом МП; 3) инкубированные с НЧ в МП = 261-339 кГц, 25 мТл ($(46 \pm 1)^\circ\text{C}$) в течение 15 мин; 4) инкубированные с НЧ в МП = 261-339 кГц, 25 мТл ($(46 \pm 1)^\circ\text{C}$) в течение 30 мин. Шкала соответствует 400 мкм

В дополнительном эксперименте культуру 4Т1 предварительно выдерживали с НЧ в течение 6 ч до воздействия МП с целью усиления взаимодействия НЧ с клетками. В этом случае как 15, так и 30 мин воздействия МП приводили к значительно улучшенным результатам, то есть, активации апоптоза/ некроза в 100% исследуемых клеток по сравнению с контролем без МП (рис. 30). Соответственно, генерации АФК на поздней стадии апоптоза не обнаруживалось (рис. 29, Б).

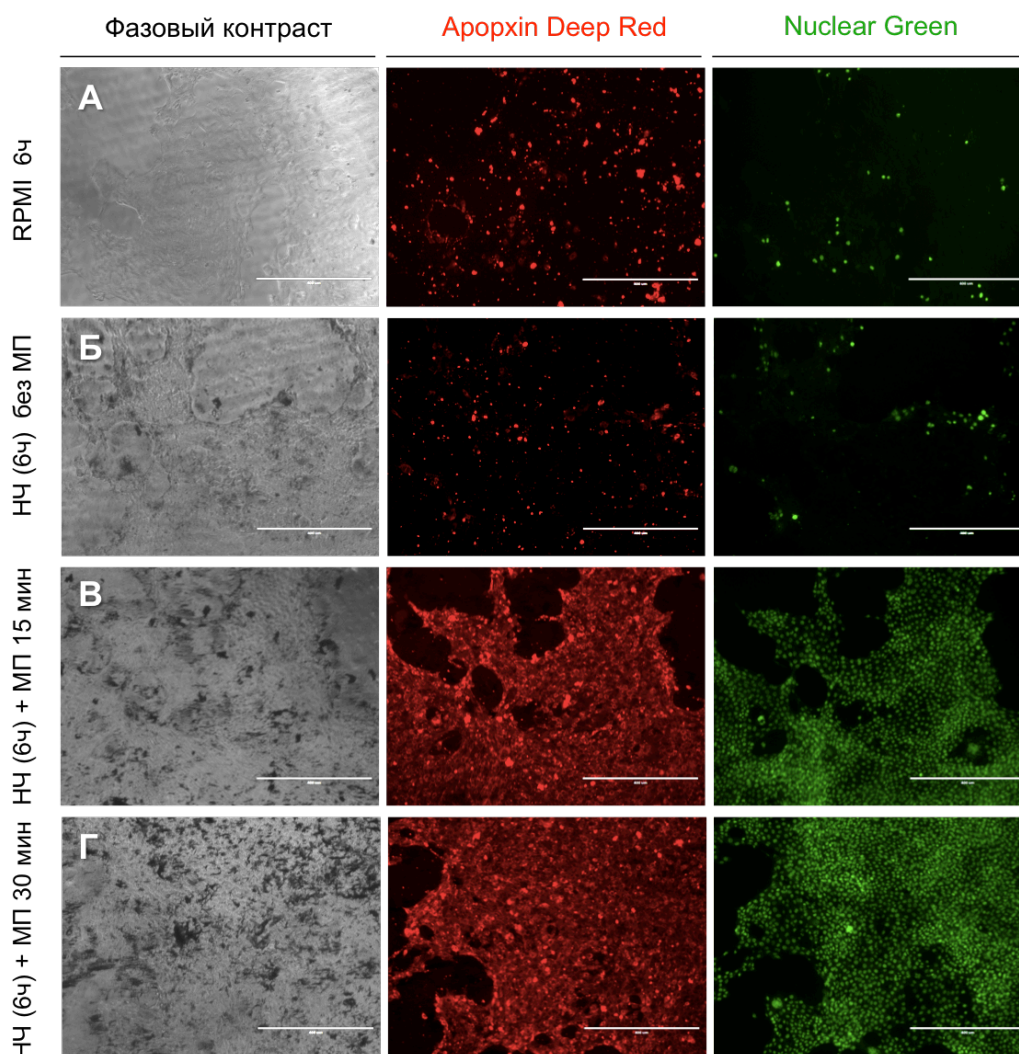


Рисунок 30. Активация апоптоза/ некроза в клетках 4Т1, предварительно культивированных с НЧ-PEG ($3,6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}$) в течение 6 ч, фазовый контраст (левый столбец) и флуоресцентная микроскопия, внутриклеточное окрашивание с помощью Apoptxin Deep Red (средний столбец) и Nuclear Green (правый столбец). А) Контрольные клетки без НЧ; Б), инкубированные с НЧ при 37°C в нулевом МП; В) инкубированные с НЧ в МП = 261-339 кГц, 25 мТл ($(46 \pm 1)^\circ \text{C}$) в течение 15 мин; Г) инкубированные с НЧ в МП = 261-339 кГц, 25 мТл ($(46 \pm 1)^\circ \text{C}$) в течение 30 мин. Шкала соответствует 400 мкм

В обоих вышеописанных экспериментах с немедленной обработкой МП, а также предварительной культивацией в течение 6 ч обнаруживался явный апоптоз / некроз клеток 4Т1, индуцированных гипертермией. При этом предварительное культивирование показывает более высокую эффективность, что может помочь снизить порог концентрации для ГМЧ в будущих исследованиях. Кроме того, полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о НЧ Fe_3O_4 или MnFe_2O_4 с полимерным покрытием, где наблюдался апоптоз / некроз различных клеточных культур

наряду с генерацией АФК [127,211–214] для идентичного диапазона концентраций (1–10 мг·мл⁻¹) и схожих условий МП. Другие эксперименты показали снижение жизнеспособности клеток 4T1 до 60–70 % после начальной инкубации клеток с магнитными НЧ [215,216]. Однако в данном исследовании был достигнут такой же уровень жизнеспособности клеток сразу после добавления НЧ, после чего проводили обработку МП. С добавлением же этапа пре-культивации клеток с НЧ в течение 6 ч, наблюдается 100 % -ная гибель культуры 4T1. Таким образом, результаты демонстрируют не только общую *in vitro* функциональность гибридных НЧ Fe₃O₄-Au для ГМЧ, но также возможность сокращения времени обработки МП, приводящего к 100 % -ной гибели клеток, если добавляется промежуточная стадия совместного культивирования клеток и НЧ. В работе [140] НЧ Fe₃O₄-Au были исследованы для лечения методом ГМЧ так называемых «мини-опухолей», состоящих из клеток SKOV-3, что является переходной стадией между экспериментами *in vitro* и *in vivo*. Учитывая более высокие значения SLP гибридных НЧ, полученных в настоящей работе, предлагаемый подход может улучшить ГМЧ в будущих экспериментах *in vivo*.

Таким образом, в данной части работы было исследовано биомедицинское применение НЧ магнетит-золото с точки зрения их магнитных свойств, а именно исследование в МРТ и ГМЧ для модельных систем и НЧ Fe₃O₄-Au различного размера. Кроме того, была проведена корреляция с выявленными ранее физическими характеристиками. R₂-релаксивность НЧ Fe₃O₄@Au находилась на уровне коммерческих контрастных агентов для МРТ. В то же время, оптимизация структуры и магнитных свойств НЧ Fe₃O₄-Au привела к существенно улучшенным T₂-контрастным свойствам по сравнению с предыдущими исследованиями и коммерческими агентами для НЧ размером 25 и 44 нм. При этом значения R₂-релаксивности вышли «на плато» в так называемом режиме SDR, что не предполагает дальнейшего роста R₂ с увеличением диаметра НЧ. Для зависимости SLP от размера НЧ наблюдается аналогичная тенденция с максимальными значениями порядка 350 и 600 Вт·г⁻¹ Fe для НЧ в 2% агарозе и воде, соответственно (SLP снижается в условиях вязкости, сопоставимых с цитоплазмой). Оптимизированный размер НЧ Fe₃O₄-Au для комбинации МРТ и ГМЧ составил около 25 нм (образец 7). Данные НЧ затем были использованы для экспериментов *in vitro* в клетках аденокарциномы молочной железы 4T1, которые показали, что (а) несмотря на падение R₂ в культуре клеток, в целом МРТ-контрастные свойства остаются на достаточно высоком уровне, подходящем для последующего использования *in vivo* и (б) НЧ обладают значительным тепловыделением *in vitro*, таким образом, индуцируют гибель клеток в условиях ГМЧ, которая достигает 100% при предварительной инкубации НЧ с клетками в течение 6 ч.

3.5 Магнито-механическое управление активностью ферментов при помощи наночастиц магнетит-золото

Как было рассмотрено в обзоре литературы (п. 1.2.5), в настоящее время активно изучаются механические эффекты на активность живых систем, и актуальной проблемой является возможность дистанционность воздействия. Ее предоставляет переменное МП, однако при этом необходим подбор оптимального дизайна НЧ – «передатчиков» магнито-механических эффектов на структуру и свойства биомакромолекул, в частности, ферментов. С данной точки зрения перспективными являются НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, дающие за счет стабильности и наличия золотой поверхности широкий выбор лигандов для функционализации с последующей возможностью ковалентного связывания биологически активных молекул. Таким образом, данный раздел посвящен исследованию НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ для магнито-механического управления активностью модельного фермента α -химотрипсина, свойства которого хорошо изучены в литературе [106,217].

3.5.1 Модификация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ферментом

Для иммобилизации α -химотрипсина на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ в работе использовали образцы, функционализированные лигандами с различной длиной углеводородной цепи: L-цистеином, 3-меркаптопропионовой кислотой, липоевой кислотой, 11-меркаптоундекановой кислотой и тиол-ПЭГ-кислотой (табл. 12). Образцы НЧ М-1 – М-5 брали в одинаковой концентрации ($25 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, что соответствует $10^{12} \text{ НЧ} \cdot \text{мл}^{-1}$) и добавляли к ним идентичное количество фермента ($600 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Кроме того, в отдельном эксперименте с НЧ, функционализированными липоевой кислотой (образец М-3), варьировали количество добавляемого в систему α -химотрипсина, что отражено в таблице 15. После завершения реакции смесь центрифугировали для выделения НЧ, далее определяли общее количество оставшегося в системе фермента, а также количество свободных аминок групп с целью подтвердить факт иммобилизации α -химотрипсина именно на поверхности НЧ.

Можно видеть, что химическая структура лиганда для функционализации НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ достоверно не сказывается на количестве связывающегося с ними фермента, и для образцов ЕМ-1 – ЕМ-5 его конечная концентрация составляла $90\text{--}100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (около 15% от исходной). При этом количество первичных аминок групп α -химотрипсина после его иммобилизации на НЧ, определенное методом титрования Fluram, во всех случаях составляло 5-7 в расчете на одну молекулу. Тот факт, что это значение меньше по

сравнению с теоретически доступным, равным 15 [218], означает, во-первых, успешную модификацию НЧ ферментом (сшивка его молекул между собой исключалась за счет удаления избытка сшивающих агентов перед внесением α -химотрипсина). С другой стороны, таким образом одна молекула фермента может быть закреплена более чем на одной НЧ что, согласно теоретическим расчетам [104,106,219,220], играет существенную роль в управлении активностью α -химотрипсина. То есть, по сравнению с мономерными структурами «НЧ-фермент», в так называемых димерных конъюгатах «НЧ-фермент-НЧ» под действием МП возможно достижение бóльших сил, действующих на молекулы α -химотрипсина за счет механического вращения НЧ [105,218].

Таблица 15. Маркировка образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ($c = 25$ мкг/мл) с иммобилизованным α -химотрипсином, а также его концентрация и количество свободных аминогрупп на 1 молекулу фермента

Образец	Маркировка НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -лиганд	Концентрация добавленного к НЧ фермента, мкг/мл	Концентрация связанного с НЧ фермента, мкг/мл	Количество свободных NH_2 -групп, шт
ЕМ-1	М-1	600	92 ± 5	7 ± 2
ЕМ-2	М-2	600	97 ± 5	6 ± 2
ЕМ-3	М-3	600	87 ± 2	6 ± 2
ЕМ-3-1	М-3	100	25 ± 2	8 ± 2
ЕМ-3-2	М-3	25	16 ± 1	7 ± 2
ЕМ-4	М-4	600	89 ± 2	5 ± 2
ЕМ-5	М-5	600	100 ± 7	5 ± 2

Тем не менее, необходимо было определить количество предполагаемых димеров в получаемой после иммобилизации белка системе, а также оптимизировать их количество. С этой целью концентрацию изначально добавленного α -химотрипсина снижали с 600 до 100 или 25 мкг/мл, что ожидаемо уменьшало его итоговое количество в иммобилизованном состоянии, однако увеличивало выход (табл. 16). После этого изучали распределение по размеру для модифицированных ферментом НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ с использованием метода НТА, позволяющего разрешать близко расположенные пики, а также определять концентрацию НЧ.

Согласно данным НТА, до модификации ферментом (образец М-3) в распределении НЧ по размерам наблюдался один выраженный максимум на 59 нм, в то время как после иммобилизации α -химотрипсина во всех случаях было получено

мультимодальное распределение по размерам (рис. 31, А-Г). Для образцов ЕМ-3, ЕМ-3-1, ЕМ-3-2 основные пики наблюдались на 71 и 129; 85 и 137; 77 и 116 нм соответственно. Предположительно, меньшие частицы (от ~70 до ~80 нм) соответствовали конъюгатам α -химотрипсина с одной НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (на которой фактически может находиться несколько десятков-сотен молекул белка). Более крупные частицы (диаметр ~ 116-137 нм) соответствуют конъюгатам, содержащим по меньшей мере две НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, связанные через молекулы α -химотрипсина. При этом соотношение интенсивностей пиков, соответствующих димерным структурам «НЧ-фермент-НЧ» и мономерам «НЧ-фермент», увеличивается с уменьшением концентрации α -химотрипсина, вводимого в систему (табл. 16). Это можно объяснить большей вероятностью одновременного связывания двух (или более) НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ с одной молекулой α -химотрипсина при меньшей концентрации белка, в отличие от присоединения нескольких молекул α -химотрипсина к поверхности одной НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ при более высокой концентрации белка. Данный вывод можно дополнительно подкрепить сравнением ПЭМ-микрофотографий образцов ЕМ-3-2 и ЕМ-3, содержащих по данным НТА максимальную и минимальную долю димеров, соответственно (рис. 31, Д и Е).

Таблица 16. Характеристика образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ($c = 25$ мкг/мл), функционализированных липоевой кислотой и варьируемым количеством иммобилизованного α -химотрипсина

Образец	Концентрация добавленного к НЧ фермента, мкг/мл	Концентрация связанного с НЧ фермента, мкг/мл	Выход иммобилизованного фермента, %	Соотношение концентраций димеров и мономеров *
ЕМ-3	600	87±2	15±1	0,4
ЕМ-3-1	100	25±2	25±2	0,9
ЕМ-3-2	25	16±1	64±5	1,6

* – рассчитанные эффективные радиусы (в экспериментах – второй пик на спектре НТА)

3.5.2 Исследование влияния магнитного поля на активность иммобилизованного фермента

Для изучения и последующей регуляции активности α -химотрипсина была выбрана катализируемая им реакция гидролиза р-нитроанилида N-бензоил-L-тирозина (BTNA) или р-нитроанилида N-сукцинил-L-аланил-L-аланил-пролил-L-фенилаланина (SAAPFNA) с оптимумом pH 8,0 – 8,2 [221,222]. Продуктом в обоих случаях является р-нитроанилин,

имеющий максимум поглощения при 405 нм. Таким образом, за кинетикой реакций можно следить спектрофотометрически по зависимости поглощения продукта от времени (линейной для субстрата BTNA в течение 30 мин, для SAAPFNA – в течение 5-7 мин).

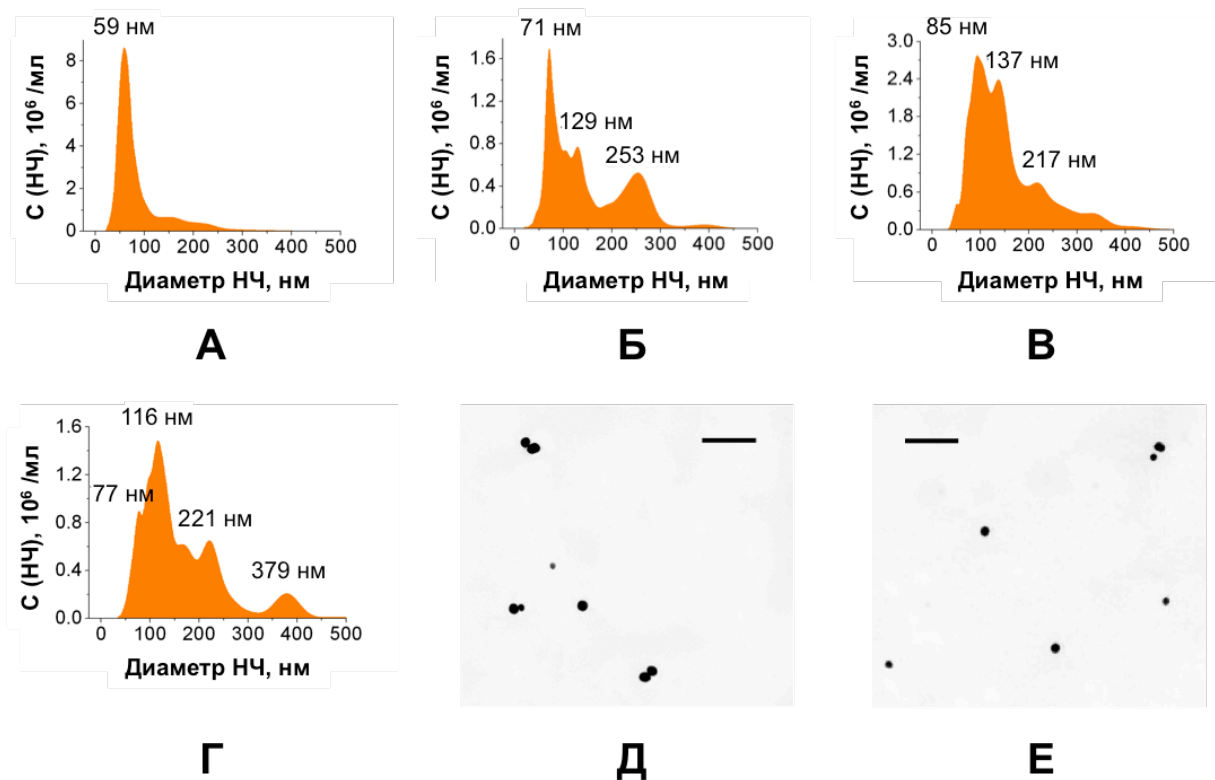


Рисунок 31. Распределение по размерам для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, функционализированных липоевой кислотой и модифицированных α -химотрипсином: данные NTA (А-Г) и ПЭМ (Д, Е). А) образец М-3; Б) образец ЕМ-3; В) образец ЕМ-3-1; Г) Образец ЕМ-3-2; Д) данные ПЭМ для Г); Е) данные ПЭМ для Е). На распределениях отмечены значения размеров, соответствующие максимумам по оси у. Шкала на микрофотографиях соответствует 200 нм

На первом этапе изучалась активность α -химотрипсина после многократного (3-4 экспозиции) воздействия МП (50 Гц, 137 мТл). Постановка эксперимента заключалась в сравнении кинетики гидролиза BTNA для двух идентичных порций реакционной смеси, одну из которых подвергали действию МП с паузами, а вторая была контрольной. После определения скорости реакции без МП, «опытную» кювету помещали в МП, а контрольную – в спектрофотометр. Далее их меняли местами и измеряли зависимость поглощения от времени в опытной кювете. Процесс повторяли 3 раза. Типичная кинетическая кривая показана на рисунке 32, А.

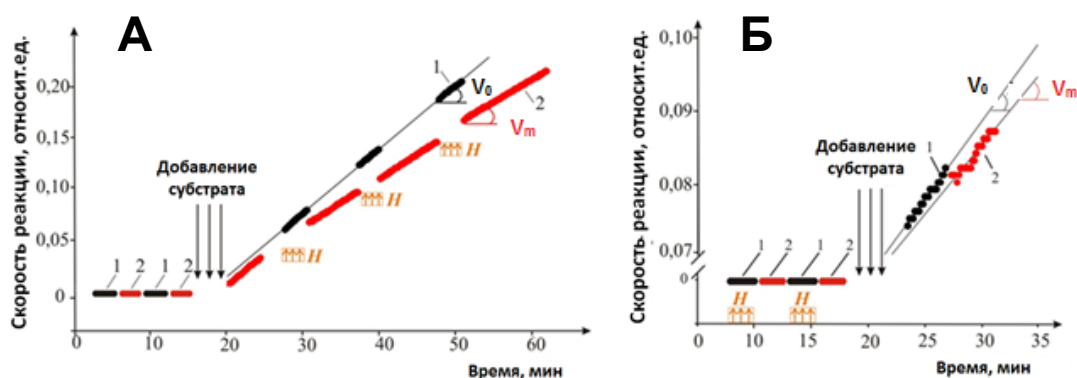


Рисунок 32. Кинетика реакции гидролиза BTNA, катализируемая α -химотрипсином (образец ЕМ-3), под действием переменного МП (137 мТл, 50 Гц). А) Обработка полем после добавления субстрата; Б) до добавления субстрата. 1 – контрольный образец без обработки в МП, 2 – образец, подвергающийся действию МП.

В случае образцов ЕМ-1, ЕМ-2, ЕМ-3 было обнаружено замедление каталитической реакции после каждой обработки в поле (рис. 32, А). Для того, чтобы выяснить природу этого эффекта, были сделаны следующие контрольные эксперименты (параметры, связанные с обработкой МП, не изменялись):

- 1) Обработка раствора свободного α -химотрипсина в МП (в соответствии с диапазоном концентраций, указанных в таблице 16), что не привело к изменению его активности;
- 2) Обработка МП смеси НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, функционализированных липоевой кислотой, и α -химотрипсина, взятых в стандартном соотношении, но без добавления сшивающих агентов – также не привело к изменению активности фермента;
- 3) Эксперимент с добавлением субстрата только после обработки раствора иммобилизованного α -химотрипсина в поле. Принципиально обнаруженный эффект может быть вызван двумя причинами: влиянием МП непосредственно на иммобилизованный α -химотрипсин, либо на его реакцию с субстратом. Для выяснения того, какой из двух механизмов является преобладающим, была сделана серия экспериментов с добавлением субстрата уже после обработки раствора иммобилизованного химотрипсина в МП (рис.32, Б); в этом случае также наблюдалось замедление скорости реакции на 10-15 %. Таким образом, подтверждается факт непосредственного влияния на структуру фермента.

Изучение зависимости эффекта МП от структуры соединения, использующегося в качестве линкера, проводили, сравнивая снижение активности иммобилизованного фермента после его обработки в МП (50 Гц, 137 мТл) для НЧ ЕМ-1, ЕМ-2, ЕМ-3, ЕМ-4, ЕМ-5.

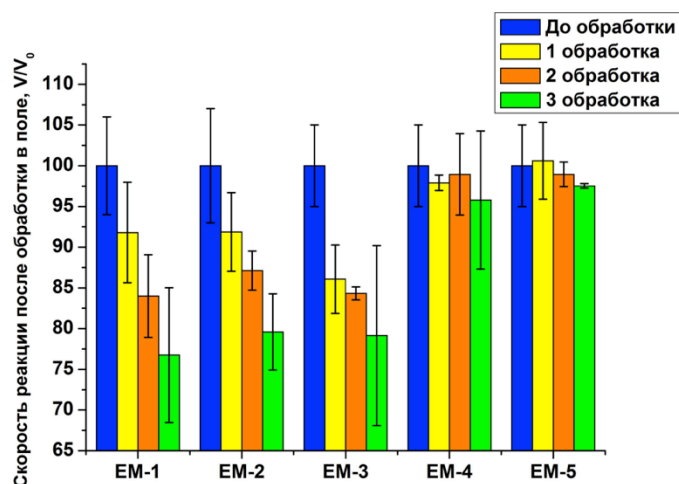


Рисунок 33. Влияние МП (137 мТл, 50 Гц) на активность α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ при помощи различных линкеров (слева направо): L-цистеин, 3-меркаптопропионовая кислота, липоевая кислота, 11-меркаптоундекановая кислота, тиол-ПЭГ-кислота

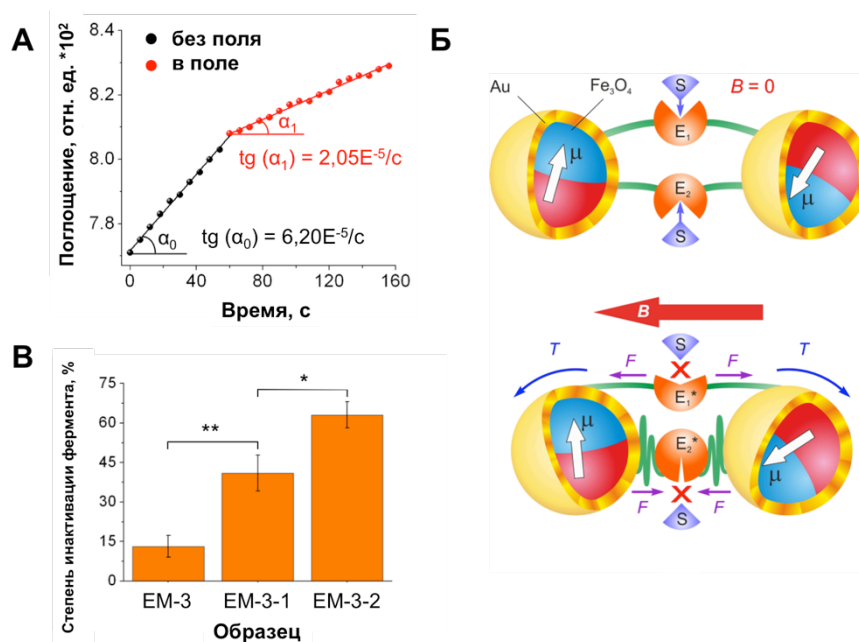


Рисунок 34. Инактивация α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, функционализированных липоевой кислотой, под воздействием переменного МП: (А) кинетическая кривая гидролиза SAAPFNA до и во время экспозиции в МП (88 мТл, 60 Гц), образец EM-3-2; (Б) Схематическое изображение магнитомеханического эффекта поля: Т – вращательный момент; F - сила, действующая на молекулы α -химотрипсина, связанные с двумя НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$; B – амплитуда поля; μ – магнитный момент НЧ; E1, E2 – исходные молекулы фермента; E1 *, E2 * – деформированные молекулы фермента; S – субстрат. (В) Степень инактивации иммобилизованного фермента для образцов EM-3, EM-3-1 и EM-3-2 (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, $n = 3$)

На рисунке 33 представлены полученные эффекты МП для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, функционализированных линкерами с разной длиной углеводородной цепи и модифицированных α -химотрипсином. Было обнаружено, что после третьей обработки полем для образцов ЕМ-1, ЕМ-2, ЕМ-3 достигается снижение скорости катализируемой реакции на 25-30%. Это может быть объяснено малой длиной и жесткостью L-цистеина и 3-меркаптопропионовой кислоты, а также наличием жесткого кольца и двух атомов серы в молекуле липоевой кислоты. В то же время, для образцов ЕМ-4 и ЕМ-5 скорость реакции оставалась практически неизменной. Это может быть следствием большой длины и гибкости молекул 11-меркаптоундекановой и тиол-ПЭГ-кислоты, за счет чего воздействие МП на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ практически не передается ферменту и тем самым не влияет на его активность [218].

Более детально эффект МП изучался на серии образцов ЕМ-3, ЕМ-3-1, ЕМ-3-2, где во всех случаях линкером выступала липоевая кислота и последовательно уменьшалось общее количество иммобилизованного белка в системе. Эффект поля в этом случае исследовали *in situ*, т.е., поле прикладывалось одновременно со спектрофотометрическим измерением кинетики реакции гидролиза SAAPFNA (приводящего к получению р-нитроанилина), что отражено на рисунке 34, А. Наблюдаемое уменьшение тангенса угла наклона прямой однозначно указывало на быстрое (в течение секунд) снижение каталитической активности иммобилизованного α -химотрипсина при включении МП.

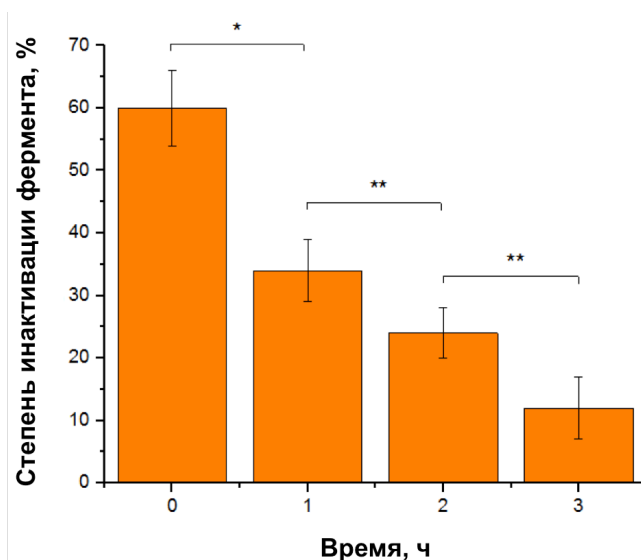


Рисунок 35. Степень инактивации α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (образец ЕМ-3-2) после воздействия МП в течение 3 мин (88 мТл, 60 Гц) спустя 1, 2 или 3 ч. Каталитическую активность определяли с использованием SAAPFNA в качестве субстрата путем измерения скорости его гидролиза субстрата, детектируя образование р-нитроанилина. * $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$ ($n = 3$)

Стоит отметить, что эффект МП (инактивация) был обратимым, однако исходная активность фермента после воздействия МП в течение 3 мин (образец ЕМ-3-2) восстанавливалась в течение нескольких часов (рис. 35). Данное явление можно объяснить релаксационными процессами, аналогичными тем, что происходят в молекулах полимеров после механической деформации с последующим снятием нагрузки [223].

Как уже упоминалось ранее, переориентация НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (изменение направления магнитного момента μ) под действием МП с амплитудой В (рис. 34, Б) может индуцировать механические деформации молекул α -химотрипсина Е1 и Е2 (из-за появления силы F) в димерных конъюгатах «НЧ-фермент-НЧ» [224], а именно их сжатие или растяжение (см. вращательные моменты T), что, в свою очередь, препятствует взаимодействию фермента с субстратом (S), вызывая снижение каталитической активности первого [225]. Данные предположения справедливы для системы, в которой одна молекула фермента присоединена, по меньшей мере, к двум НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$. В связи с этим стояла задача сравнить величину эффекта поля для образцов ЕМ-3, ЕМ-3-1, ЕМ-3-2 с возрастающей долей так называемых димерных структур «НЧ-фермент-НЧ». Как видно из рисунка 34, В, эффект поля в данном ряду также отличался. Наибольшее снижение каталитической активности фермента наблюдалось для образца ЕМ-3-2, содержащего максимальную долю димеров по данным НТА и ПЭМ. Напротив, наименьший эффект поля был обнаружен для образца ЕМ-3, имеющего в составе наибольшее содержание мономеров «НЧ-фермент». Следует отметить, что оптимизация доли димеров в системе также привела к повышению максимально возможного эффекта поля (64% по сравнению с ранее упомянутыми 30%).

Таким образом, НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ были модифицированы α -химотрипсином, иммобилизация которого на поверхности НЧ была подтверждена титрованием первичных аминогрупп. Снижение общей концентрации фермента позволила добиться увеличения количества так называемых «димерных» конъюгатов «НЧ-фермент-НЧ». Получение данных структур в совокупности с магнитными свойствами НЧ позволили успешно использовать их для регулирования каталитической активности иммобилизованного α -химотрипсина при помощи переменного низкочастотного МП (в том числе, *in situ*). Она была снижена вплоть до 36% от исходной за счет механических деформаций молекул фермента при переориентации НЧ, которые, согласно теории [225,226], генерируют осциллирующие силы $\approx 5\text{-}10$ пН, достаточные для изменения конформации биомолекул. С практической точки зрения данный подход может способствовать дистанционному включению / выключению ферментативных реакций в биологических системах.

3.6 Наночастицы магнетит-золото как платформа для тераностики и мультимодальной визуализации

Оптимизация физических свойств (достижение намагниченности насыщения объемного материала и высокой эффективной анизотропии, см. главу 3.3) для НЧ Fe_3O_4 -Au размером 25 нм (образец 7) позволила достичь высокой контрастирующей и тепловыделительной способности в МРТ и ГМЧ *in vitro*. На этапе оптимизации химических свойств была продемонстрирована возможность как «одиночной», так и «двойной» селективной функционализации (противоопухолевым препаратом и флуоресцентным красителем/ двумя флуоресцентными красителями) для отслеживания самих НЧ-носителей, а также загруженного на них действующего вещества (см. главу 3.4).

Завершающим этапом данной работы стало изучение НЧ Fe_3O_4 -Au как платформы для тераностики и мультимодальной визуализации. С этой целью на стадии *in vitro* было необходимо подтвердить отсутствие гемолитического ответа и генерации АФК, исследовать процесс интернализации НЧ клетками, а также изучить кинетику и динамику высвобождения загруженного действующего вещества. На стадии *in vivo* требовалось исследование стабильности НЧ в кровотоке, подтверждения накопления в опухоли, изучение биораспределения НЧ в органах. На заключительном этапе исследования НЧ использовали для МРТ-диагностики *in vivo*, а также визуализировали процесс высвобождения препарата из НЧ в опухоли в режиме реального времени. В качестве модели была выбрана аденокарцинома молочной железы мыши 4T1, уже рассмотренная ранее в тестах на токсичность НЧ. В *in vivo* МРТ также исследовалась меланома мыши B16-F10.

3.6.1 Изучение токсичности и интернализации наночастиц *in vitro*

Поскольку в качестве основного механизма цитотоксичности магнитных НЧ во многих работах был предложен окислительный стресс [227–229], следующей стадией после MTS-теста НЧ-Cy5 (рис. 21) стала детекция АФК после их инкубации с клетками 4T1 в диапазоне концентраций 0 – 333 мкг·мл⁻¹ Fe_3O_4 в течение 4 и 24 ч, а также тест на гемолиз (рис. 36). Было установлено, что только максимальная использованная концентрация НЧ-Cy5 (333 мкг·мл⁻¹ Fe_3O_4) приводит к повышению уровня продуцируемых АФК через 24 ч после начала инкубации, в то время как после 4 ч инкубации только единичные клетки генерировали АФК (рис. 36, А).

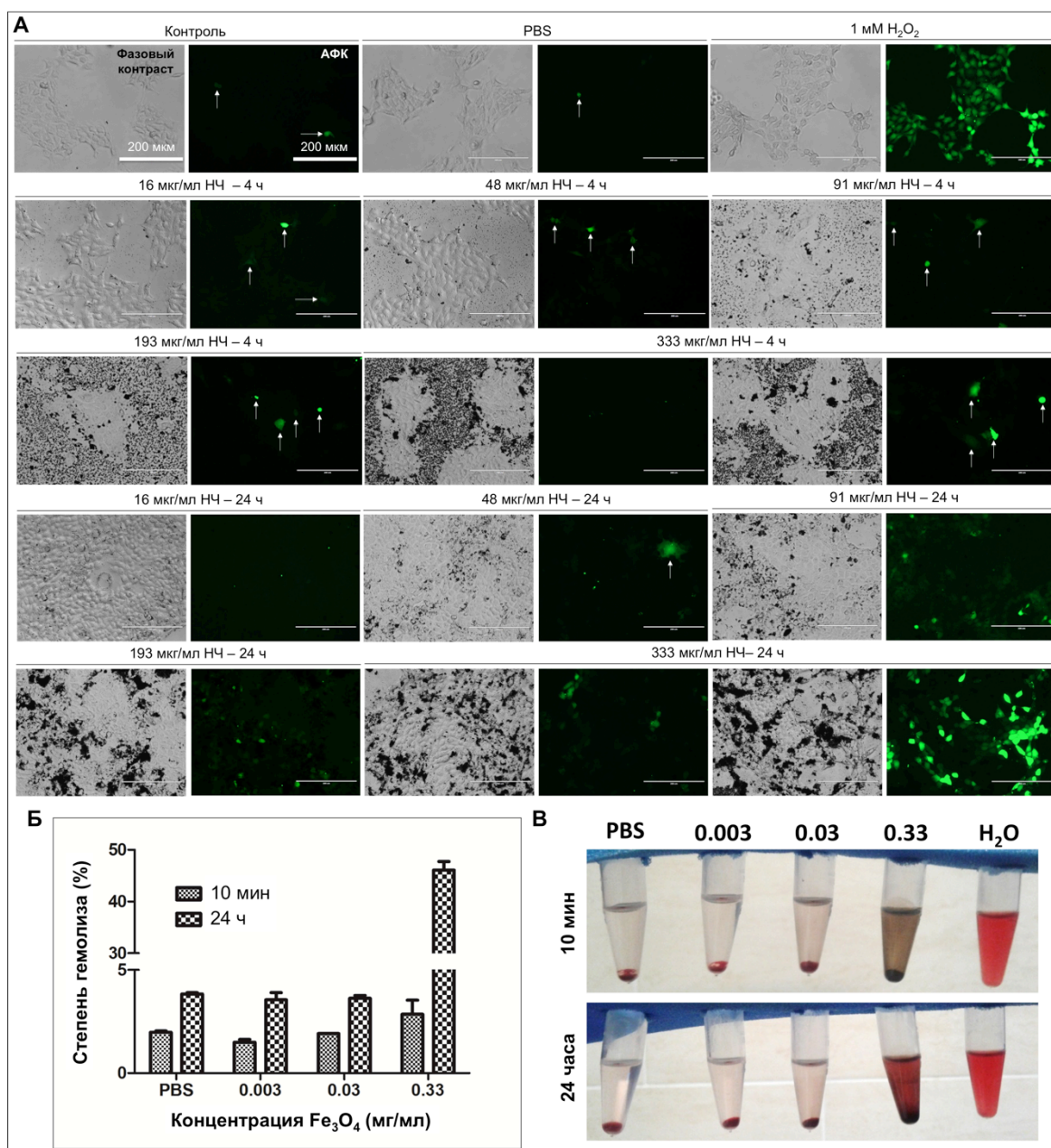


Рисунок 36. А) Генерация АФК клетками 4Т1, культивируемыми с различными концентрациями НЧ-Су5 в течение 4 ч и 24 ч, фазовый контраст и флуоресцентная микроскопия, внутриклеточное окрашивание H2DCFDA. В качестве контроля (верхняя панель) представлены клетки, инкубированные в среде RPMI, в RPMI с добавлением PBS и 1 мМ H₂O₂. Белые стрелки указывают на единичные клетки с повышенным уровнем АФК. Б-В) Гемолитический ответ мышиных эритроцитов (RBC), инкубированных с различными концентрациями НЧ-Су5, PBS или DI H₂O в течение 10 мин и 24 ч при комнатной температуре. Б) Процент гемолиза, по сравнению с положительным (DI H₂O) и отрицательными (PBS) контролями. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD. В) Репрезентативные изображения пробирок, содержащих RBC + PBS, НЧ-Су5 в различной концентрации или DI H₂O после 10 мин (верхняя панель) и 24 ч (нижняя панель) инкубации с последующим центрифугированием

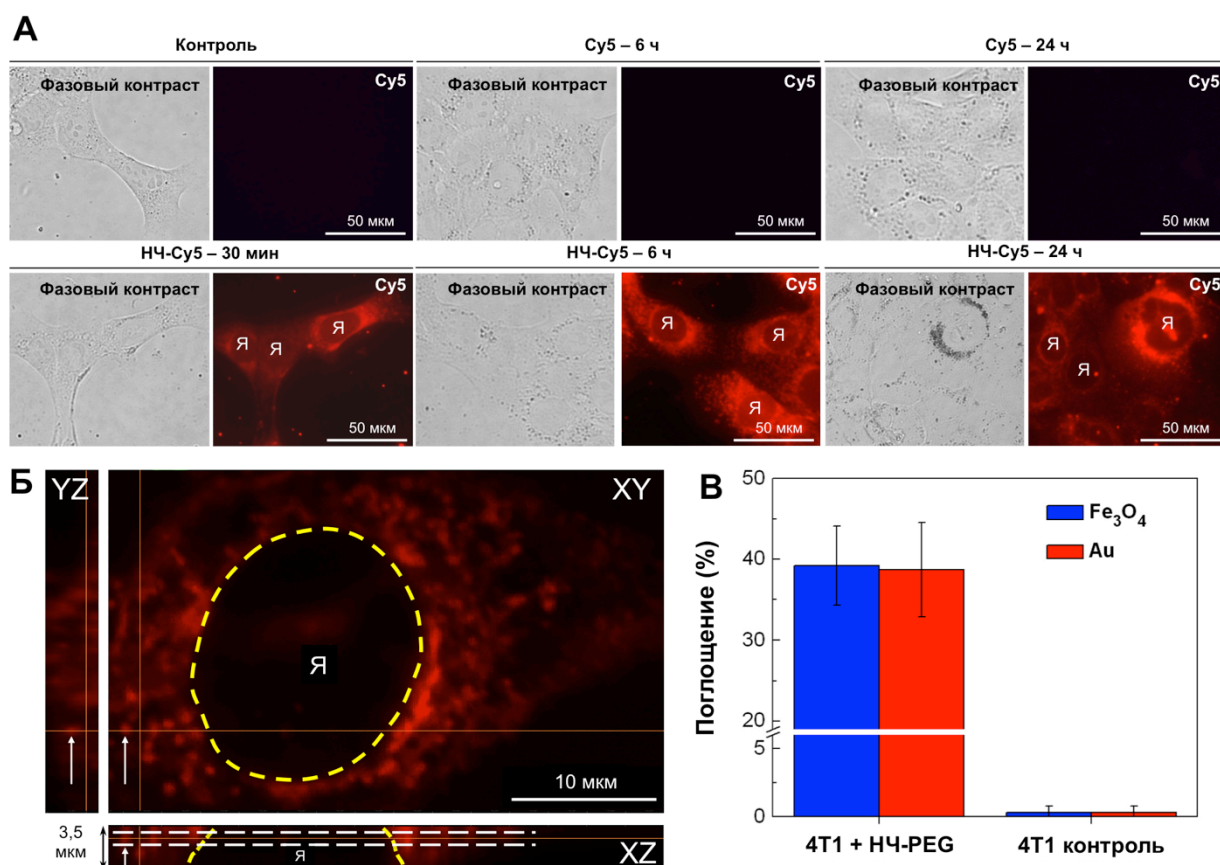


Рисунок 37. Интернализация НЧ Fe₃O₄-Au клетками 4T1. А) Динамика накопления свободного Cu5 (6 мкг·мл⁻¹, верхняя панель) и НЧ-Cu5 (193 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 30 мкг·мл⁻¹ Au, 6 мкг·мл⁻¹ Cu5, нижняя панель) в клетках 4T1 через 30 мин, 6 ч и 24 ч после начала инкубации. Б) XY-, XZ- и YZ-проекция Z-стеков клетки 4T1 (8 шагов по 500 нм каждый) после инкубации с НЧ-Cu5 в течение 30 мин (30 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 5 мкг·мл⁻¹ Au, 1 мкг·мл⁻¹ Cu5). Белые стрелки указывают на НЧ внутри цитоплазмы в трех ортогональных проекциях. Белая пунктирная линия – оптический срез через ядро опухоли (Я), выделенное желтой пунктирной линией, содержащий НЧ (стрелка). В) Поглощение НЧ-Cu5 клетками 4T1 после 48 ч инкубации (100 мкг мл⁻¹ Fe₃O₄, 15 мкг·мл⁻¹ Au) по данным АЭС. Представлены средние значения ± SD (n=3)

Гемолитическая активность НЧ-Cu5 *ex vivo* для эритроцитов мыши (рис. 36, Б-В), определяемая по поглощению супернатанта при длине волны 540 нм, также проявлялась только при максимальной использованной концентрации НЧ (333 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄) и только спустя 24 ч после их инкубации с клетками.

Для более детального изучения взаимодействия НЧ-Cu5 с клетками 4T1 была исследована динамика их накопления в течение 24 ч (рис. 37). Накопление НЧ в цитоплазме обнаруживалось уже спустя 30 мин после внесения НЧ (193 мкг·мл⁻¹ Fe₃O₄, 30 мкг·мл⁻¹ Au, 6 мкг·мл⁻¹ Cu5) к клеткам и увеличивалось спустя 6 ч (рис. 37, А). При

этом через 30 мин после начала инкубации происходило диффузное распределение НЧ-Су5 в цитоплазме клетки с повышенным накоплением в перинуклеарной области. Предположительно, механизмом захвата НЧ клетками является рецептор-опосредованный эндоцитоз [230]. Спустя 6 ч инкубации НЧ-Су5 обнаруживались в виде агрегатов и локализовались вблизи ядер клеток, а также в клеточных ламеллах, предположительно из-за накопления в поздних эндосомах и/или мультивезикулярных телах [230]. Свободный краситель Су5, используемый как контроль, в аналогичных условиях не накапливался в клетках. Интернализация НЧ-Су5 подтверждалась методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Оптические 3D-срезы однозначно свидетельствовали о том, что НЧ накапливаются во внутриклеточном пространстве, а не на поверхности клеточных мембран (рис. 37, Б). Количественная оценка накопления Fe_3O_4 и Au в клетках, инкубированных в течение 48 ч с НЧ-Су5 ($100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $15 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Au}$), методом АЭС подтверждала интернализацию НЧ на уровне $39 \pm 5 \%$ от добавленной дозы (рис. 37, В). Следует подчеркнуть, что данное соотношение для Fe_3O_4 и Au одинаково; по всей видимости, гибридные НЧ сохраняют свою гантелевидную структуру в условиях *in vitro* экспериментов.

3.6.2 Использование наночастиц для доставки препарата в клетки опухоли *in vitro*

Кинетику и динамику высвобождения загруженного на НЧ препарата *in vitro* изучали на примере DOX-НЧ-Су5. Предварительно были проведены эксперименты по высвобождению DOX ($1000 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $154 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Au}$, $33 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Су5}$, $285 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ DOX}$) в культуральной среде RPMI (pH = 7,2) и 0,1 М ацетатном буфере (pH = 4,7). В заданные моменты времени НЧ центрифугировали, измеряли поглощение при $\lambda = 480 \text{ нм}$, соответствующее DOX в супернатанте, пересчитывали его в количество высвободившегося препарата и выражали в % от загруженного. Кинетические кривые на рисунке 38, А демонстрируют, что этот процесс является pH-зависимым: в RPMI только 13% загруженного DOX высвобождается в течение 48 ч, тогда как в 0,1 М ацетатном буфере почти 20% DOX выходит из НЧ в течение первых 2 ч, а спустя 48 ч это количество удваивается. Повышение скорости высвобождения DOX при более низком pH предположительно связано с его более высокой растворимостью в этих условиях [231,232]. Следовательно, можно ожидать, что при инкубации в среде RPMI DOX-НЧ-Су5 будут удерживать загруженный DOX до момента интернализации клетками с последующим высвобождением лекарственного средства при попадании DOX-НЧ-Су5 в среду с низким pH (например, в эндолизосомы).

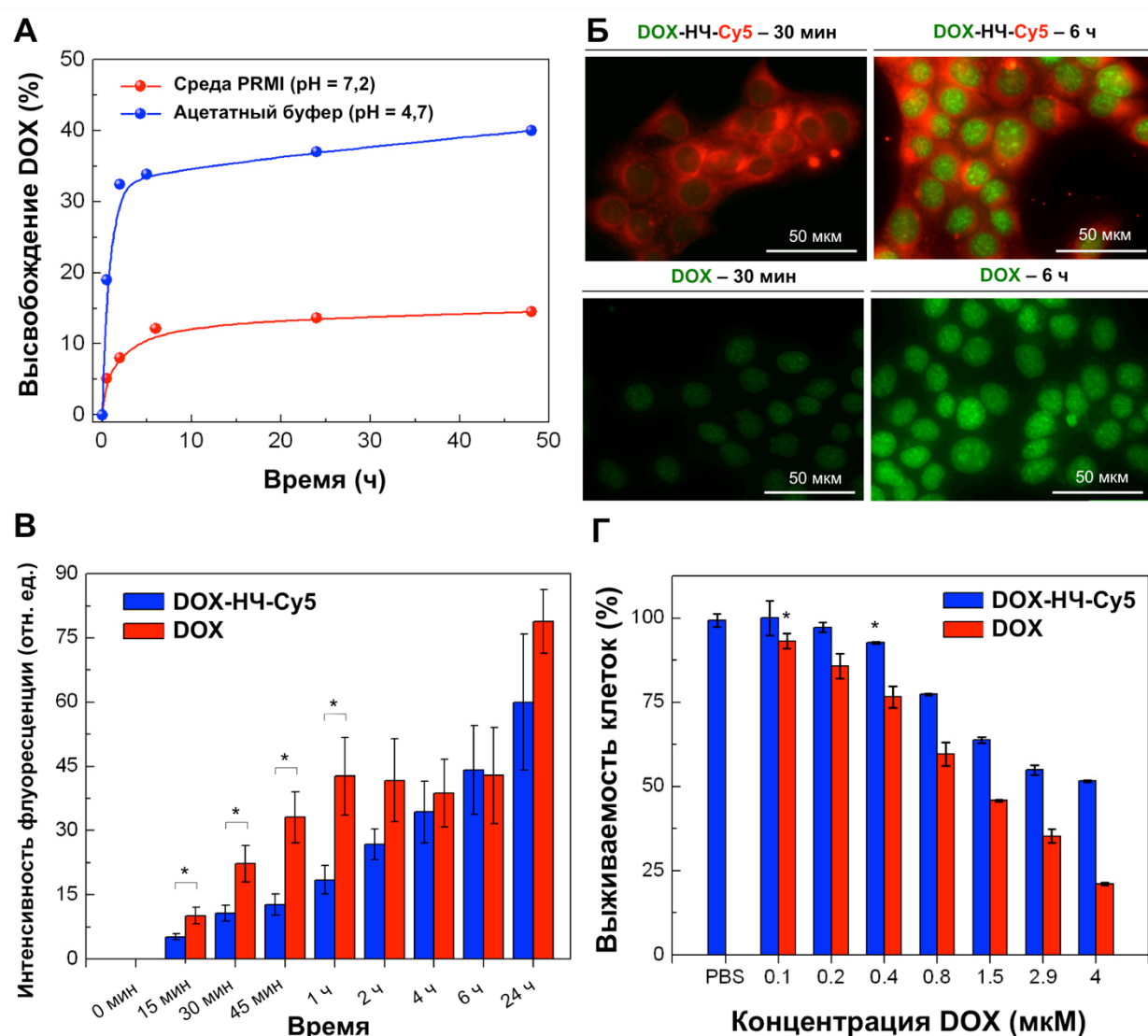


Рисунок 38. Доставка DOX в клетки 4T1 с помощью НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$. А) pH-зависимая кинетика высвобождения DOX из DOX-НЧ-Cy5 в среде RPMI (pH = 7,2) и ацетатном буфере (pH = 4,7) при 37°C в течение 48 ч. Б-В) Динамика накопления DOX-НЧ-Cy5 ($63 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $2 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Cy5}$, $18 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ DOX}$ (31 мкМ), верхняя панель) и свободного DOX (31 мкМ, нижняя панель) в клетках 4T1: Б) Репрезентативные изображения, иллюстрирующие накопление DOX-НЧ-Cy5 (верхняя панель) и свободного DOX (нижняя панель), полученные методом флуоресцентной микроскопии в клетках 4T1 через 30 мин и 6 ч после начала инкубации; зеленый цвет - DOX; красный - НЧ-Cy5. В) Количественная оценка интенсивности флуоресценции DOX в ядрах клеток 4T1 при инкубации с DOX-НЧ-Cy5 (синие столбцы) и свободным DOX (красные столбцы). Результаты показаны как среднее значение $\pm \text{SD}$, * $p < 0,05$ (ANOVA). Г) Выживаемость клеток 4T1 после 48 ч инкубации с DOX-NP-Cy5 (синие столбцы) и свободного DOX в концентрации 0 – 4 мкМ (красные столбцы) по результатам MTS-теста. Результаты представлены как среднее значение $\pm \text{SD}$, * $p < 0,05$ (ANOVA) по сравнению с контрольными клетками, инкубированными с 1xPBS

Для того, чтобы исследовать эффективность доставки DOX, загруженного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, клетки 4T1 инкубировались с DOX-НЧ-Cy5 в течение 48 ч ($63 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $2 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Cy5}$, $18 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ DOX}$), при этом динамика накопления в клетках для лекарственного препарата, доставленного на НЧ, сравнивалась в разные моменты времени со свободным DOX той же концентрации. В обоих случаях наблюдалось постепенное увеличение интенсивности флуоресценции DOX в ядрах клеток (рис. 38, Б). Несмотря на то, что на ранних стадиях инкубации (15 мин – 1 ч) свободный DOX имеет тенденцию к более быстрому накоплению по сравнению с DOX-НЧ-Cy5 (рис. 38, В), через 2 – 4 ч эта разница уменьшается, а после 6 ч инкубации клеток с НЧ / DOX она находится в пределах погрешности. Согласно данным MTS-теста, DOX-НЧ-Cy5 проявляют дозозависимую токсичность для клеток 4T1 после 48 ч инкубации (рис. 38, Г), однако меньшую по сравнению со свободным DOX ($\text{IC}_{50} = 4 \text{ мкМ}$ и $1,2 \text{ мкМ DOX}$, соответственно). Наиболее вероятная причина наблюдаемого различия – непрерывное проникновение свободного DOX в клетки через плазматическую мембрану при его пассивной диффузии [233]; в тоже время, интернализация DOX-НЧ-Cy5 [230,234] и последующее высвобождение DOX требуют больше времени. При этом НЧ должны связаться с плазматической мембраной клеток, проникнуть во внутриклеточное пространство при помощи активного эндоцитоза, и после этого попасть в эндолизосому с низким pH (4,5 – 5,0) для высвобождения DOX. Тем не менее, представленные результаты доказывают, что НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ действительно могут быть использованы для *in vitro* доставки лекарственного препарата в клетки опухоли.

3.6.3 Изучение стабильности наночастиц в кровотоке, их накопления в опухоли и биораспределения

Как правило, до 99% внутривенно введенных в организм НЧ задерживаются в печени и/или селезенке, в результате чего эффективность пассивной доставки НЧ в опухоль резко снижается [75]. Скорость выведения НЧ из кровотока зависит от их размера, заряда и химии поверхности, поэтому катионные НЧ большего размера в значительной степени захватываются печенью и селезенкой по сравнению с малыми нейтрально заряженными НЧ [235,236]. Таким образом, для эффективной доставки в опухоль необходимо создание стабильных НЧ, циркулирующих в кровотоке в течение долгого времени (часы).

К настоящему времени во многих исследованиях была продемонстрирована эффективность нацеливания НЧ для избирательного уничтожения опухолевых клеток *in*

vitro, при этом менее 1% от дозы внутривенно введенных НЧ достигает опухоли в условиях *in vivo*, что является основным лимитирующим фактором для использования НЧ в клинике [75,237]. Следовательно, одной из центральных стратегий в данной области является повышение эффективности *in vivo* доставки НЧ, основанной на эффекте повышенной проницаемости и удержания в опухоли (EPR-эффекте) [238].

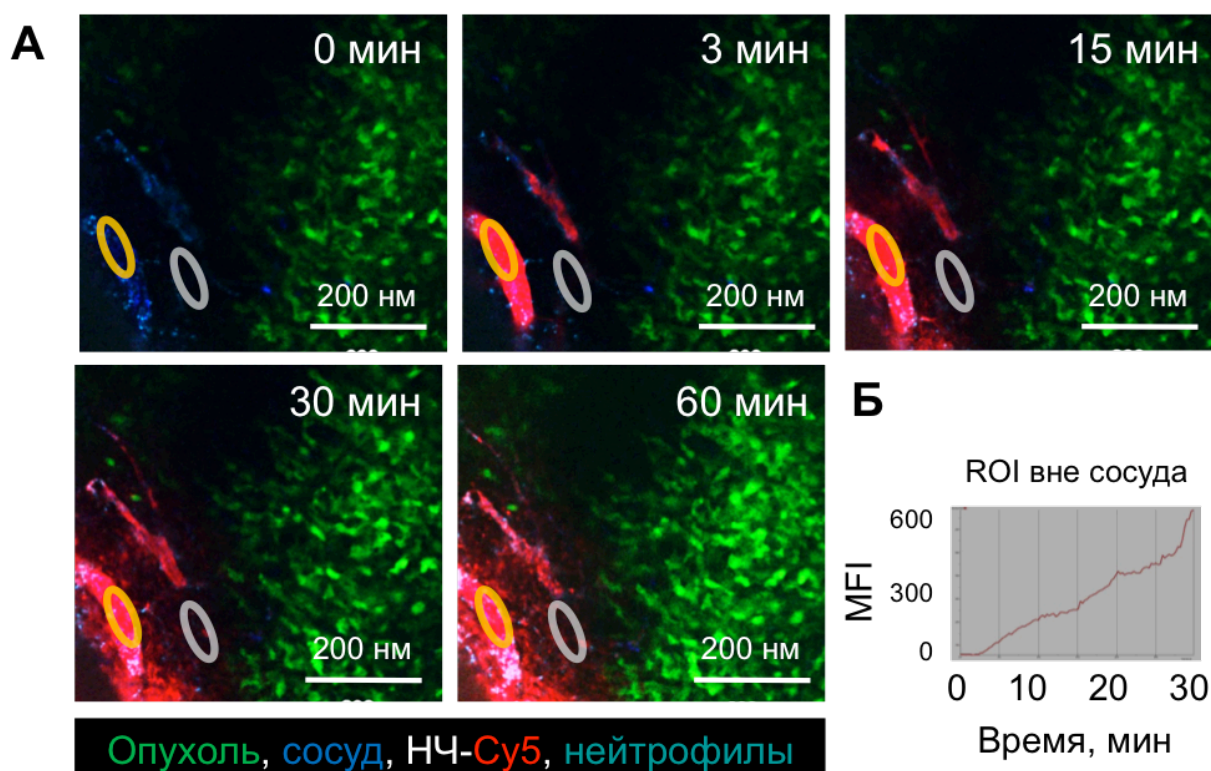


Рисунок 39. Накопление гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в опухоли 4T1. А) Визуализация микроокружения опухоли 4T1-GFP с помощью ИВМ при внутривенном введении НЧ-Су5 ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$); синий цвет - CD49b, зеленый цвет - 4T1-GFP, красный цвет - НЧ-Су5, голубой цвет - Ly6G; желтый круг - область интереса (ROI) внутри сосуда, серый круг - ROI вне сосуда. Б) Рост ROI вне сосуда в течение 30 мин после введения НЧ

Доставка гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в ткань опухоли изучалась методом ИВМ при внутривенном введении НЧ-Су5 в дозе $6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$ лабораторным мышам с привитыми опухолями 4T1, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок (GFP) (рис. 39). Спустя 1-3 мин после системного введения можно было наблюдать НЧ, устойчиво циркулирующие в сосудах опухоли без признаков агрегации (рис. 39, А). Примечательно, что средняя интенсивность флуоресценции (MFI) внутри сосудов быстро возрастала в течение первых минут и оставалась стабильной, по меньшей мере, в течение 30 мин, что указывает на замедленное выведение НЧ из кровотока. Спустя 15 мин после введения, НЧ-Су5 обнаруживались вне опухолевых сосудов, и MFI (рис. 39, Б)

продолжала расти в течение всего времени наблюдения (60 мин). Диффузия НЧ в опухолевую ткань в основном ограничена периваскулярной областью диаметром 100 мкм. В литературе предполагается, что важную роль в накоплении НЧ в злокачественных тканях и последующем высвобождении загруженных на них лекарств играют опухолевые макрофаги [239]. В соответствии с этим была действительно обнаружена адсорбция НЧ на периваскулярных клетках стромы, предположительно, макрофагах.

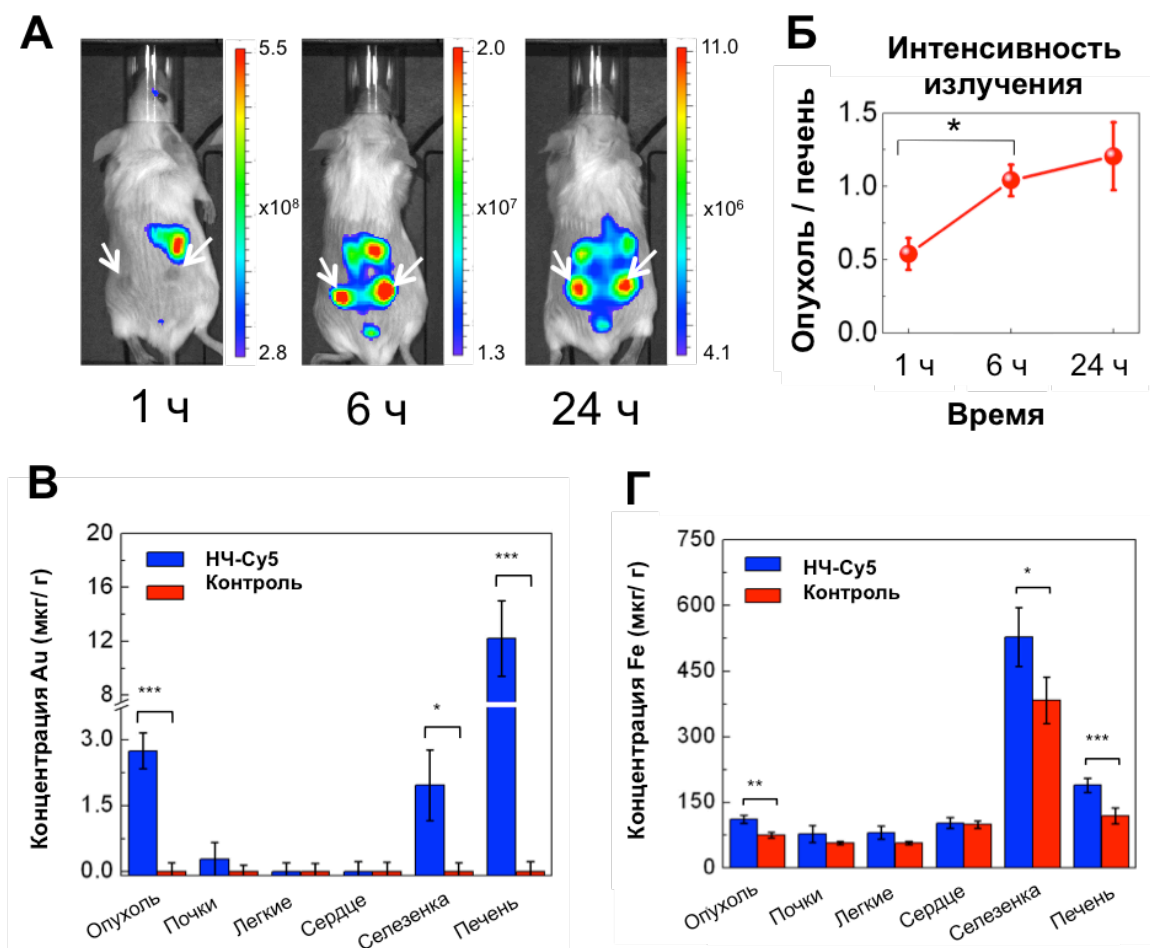


Рисунок 40. Накопление гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в опухолях 4Т1. А) Серия IVIS-изображений мыши с двумя привитыми опухолями 4Т1 после внутривенного введения НЧ-Су5 ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$), демонстрирующая накопление НЧ в опухолях спустя 1, 6 и 24 ч после инъекции (цветовая шкала соответствует интенсивности флуоресценции). Б) Соотношение интенсивности флуоресценции «опухоль/ печень» спустя 1, 6 и 24 ч после инъекции НЧ-Су5. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD; * $p < 0,05$ (ANOVA) В-Г) Биораспределение НЧ-Су5 (В – по Au, Г – по Fe) в организме мышей с привитыми опухолями 4Т1 через 24 ч после внутривенного введения ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $1,0 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Au}$, синие столбцы) по сравнению с контрольными мышами (красные столбцы). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (ANOVA)

Последующая динамика накопления НЧ-Cy5 в опухолях была исследована методом IVIS (рис. 40). В соответствии с первоначальными предположениями, через 1 ч после внутривенного введения НЧ в основном обнаруживаются в печени и селезенке, однако спустя 6 ч после инъекции отчетливо наблюдается накопление НЧ в опухолевой ткани (рис. 40, А и Б). Несмотря на то, что через 24 ч общая интенсивность сигнала незначительно уменьшается, интенсивность флуоресценции опухолей относительно сигнала в печени постоянно увеличивается, начиная с 1 ч после введения НЧ (рис. 40, Б).

Количественное биораспределение НЧ-Cy5 в организме мышей с опухолями 4Т1 определялось методом АЭС путем измерения концентраций Fe и Au в опухолях, почках, легких, сердце, селезенке и печени при растворении органов в царской водке через 24 ч после инъекции НЧ. В соответствии с данными IVIS, накопление золота обнаруживается в основном в печени, опухолях и селезенке (рис. 40, В); аналогичный профиль биораспределения получен и для железа (рис. 40, Г). При этом относительные концентрации Au и Fe ($\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ ткани) в печени и селезенке выше, чем в опухолях, что, на первый взгляд, противоречит данным IVIS. Однако было высказано предположение, что IVIS недооценивает накопление НЧ в глубоко залегающих внутренних органах вследствие рассеяния света от тканей. Тем не менее, по данным АЭС в течение 24 ч после внутривенной инъекции до 3% от введенной дозы НЧ достигает опухоли. Данная величина в три раза выше, чем средний показатель эффективности для пассивной доставки НЧ, недавно опубликованный в работе Wilhelm и соавторов [75]. Вероятно, существенную роль в накоплении играет покрытие НЧ DSPE-ПЭГ-COOH, усиливающее взаимодействие с клетками за счет наличия липидоподобной части. Таким образом, полученные данные показывают, что при системном введении гибридные НЧ Fe_3O_4 -Au пассивно накапливаются в опухолевой ткани вследствие EPR-эффекта.

3.6.4 Доставка загруженного на наночастицы препарата в опухоль и его высвобождение

Доставка лекарств, загруженных на НЧ, в опухоль является существенным, но самим по себе не достаточным для эффективного лечения фактором в связи с тем, что для осуществления терапевтического воздействия требуется высвобождение лекарства из носителя. Две различные поверхности для химической модификации делают НЧ Fe_3O_4 -Au уникальным инструментом для одновременного изучения биораспределения самих частиц-носителей, а также загруженного на них препарата, что продемонстрировано в работе на примере NRed-НЧ-Cy5. В то время как флуоресцентная метка Cy5 ковалентно связана с НЧ Au в составе структуры Fe_3O_4 -Au, позволяя отслеживать нахождение

последних в организме, модельный краситель Nile Red нековалентно загружен в полимерную оболочку на НЧ Fe_3O_4 , имитируя гидрофобное лекарство (например, паклитаксел), которое при этом может быть визуализировано *in vivo* благодаря своим флуоресцентным свойствам. Кроме того, что недавние исследования показывают, что Nile Red может также быть использован в качестве фотосенсибилизатора [240,241]. Доставка и распределение NRed-НЧ-Cy5 изучалась методом ИВМ у мышей с привитыми опухолями 4T1-GFP (рис. 41). Вследствие высокой интенсивности флуоресценции Cy5 обнаруживается на единичных НЧ, в результате чего сосудистая сеть опухоли может быть визуализирована сразу же после внутривенного введения НЧ. Напротив, уровень флуоресценции Nile Red в тканях ниже по сравнению с Cy5, поэтому колокализация флуоресцентных сигналов обеих меток наблюдается только для агрегатов НЧ в сосудах (рис. 41, А). Высвобождение Nile Red из НЧ в микроокружение опухоли удалось визуализировать в режиме реального времени (рис. 41, Б). В течение 2 мин после прикрепления NRed-НЧ-Cy5 к стенке сосуда краситель диффундирует в окружающую сосуд опухолевую ткань.

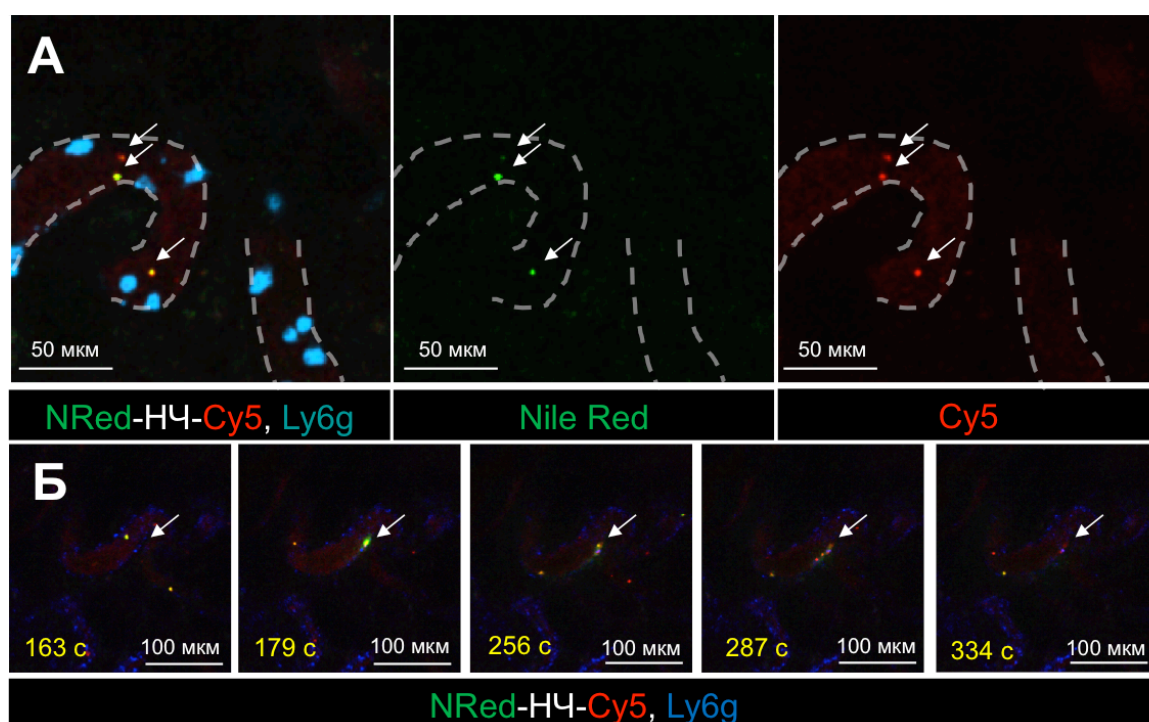


Рисунок 41. Визуализация NRed-НЧ-Cy5 в поверхностных сосудах опухоли 4T1 при внутривенном введении ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$) методом ИВМ. А) NRed-НЧ-Cy5 и агрегаты НЧ (желтый цвет), циркулирующие в сосудистой сети опухоли (пунктирные линии). Голубой цвет - нейтрофилы (Ly6G), зеленый – Nile Red, красный - Cy5. Б) Высвобождение Nile Red в опухолевой ткани (стрелка). Синий цвет - нейтрофилы (Ly6G), зеленый – Nile Red, красный - Cy5

На следующем этапе было исследовано накопление НЧ-носителей и загруженного на них модельного красителя в опухоли спустя 6 ч после внутривенного введения NRed-НЧ-Cy5 (рис. 42). При этом связанный с НЧ краситель Cy5 обнаруживался в опухолевой ткани (рис. 42, А и Б), в то время как в контрольной опухоли аналогичный сигнал отсутствовал (рис. 42, В). При этом его ко-локализации с Nile Red не наблюдалось, по-видимому, вследствие высвобождения последнего с поверхности НЧ. В связи с его липофильными свойствами, Nile Red также окрашивал периваскулярные липоциты.

Вышеприведенные эксперименты показывают, что гибридные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ являются подходящими носителями для доставки гидрофобных лекарств в микроокружение опухоли. Многообещающей перспективой в этой области является также сочетание на НЧ молекул лекарств и низкомолекулярных лигандов с клеточным рецепторам (например, PSMA-лигандов [242,243]), что позволяет использовать полученные биоконъюгаты для адресной доставки лекарств к конкретным клеткам [8].

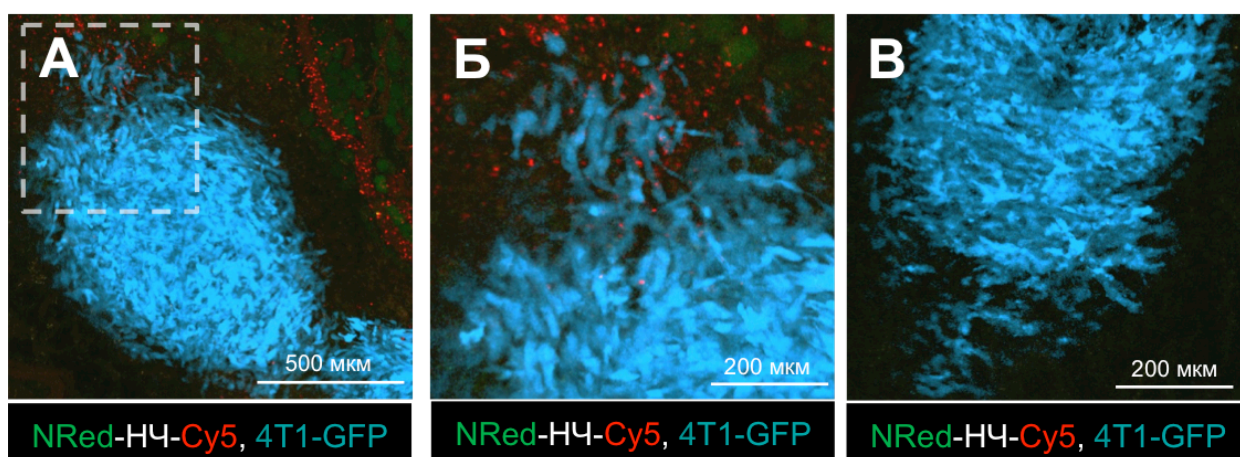


Рисунок 42. Доставка загруженного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ препарата в опухоль мыши. А) ИВМ-изображение опухоли 4T1-GFP (голубой цвет), накапливающей NRed-НЧ-Cy5 через 6 ч после внутривенного введения. Зеленый цвет – Nile Red, красный - Cy5. Б) увеличенное изображение выбранной области из (А). В) визуализация опухоли 4T1-GFP контрольной мыши, которой не вводились НЧ, методом ИВМ

3.6.5 Наночастицы магнетит-золото как контрастные агенты для МРТ-диагностики *in vivo*

Гибридные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, полученные в данной работе, обладают всеми необходимыми свойствами с точки зрения платформы для терапии (глава 3.6), при этом их «двойная» функционализация позволяет наблюдать за распределением в организме как НЧ-носителей, так и загруженного лекарственного препарата. Кроме того, уникальные

магнитные свойства НЧ ведут к их высокой R_2 -релаксивности в МРТ, что было показано на примере фантомных изображений в воде и агарозе (глава 3.4). На заключительном этапе изучался потенциал НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ для МРТ-диагностики *in vivo*.

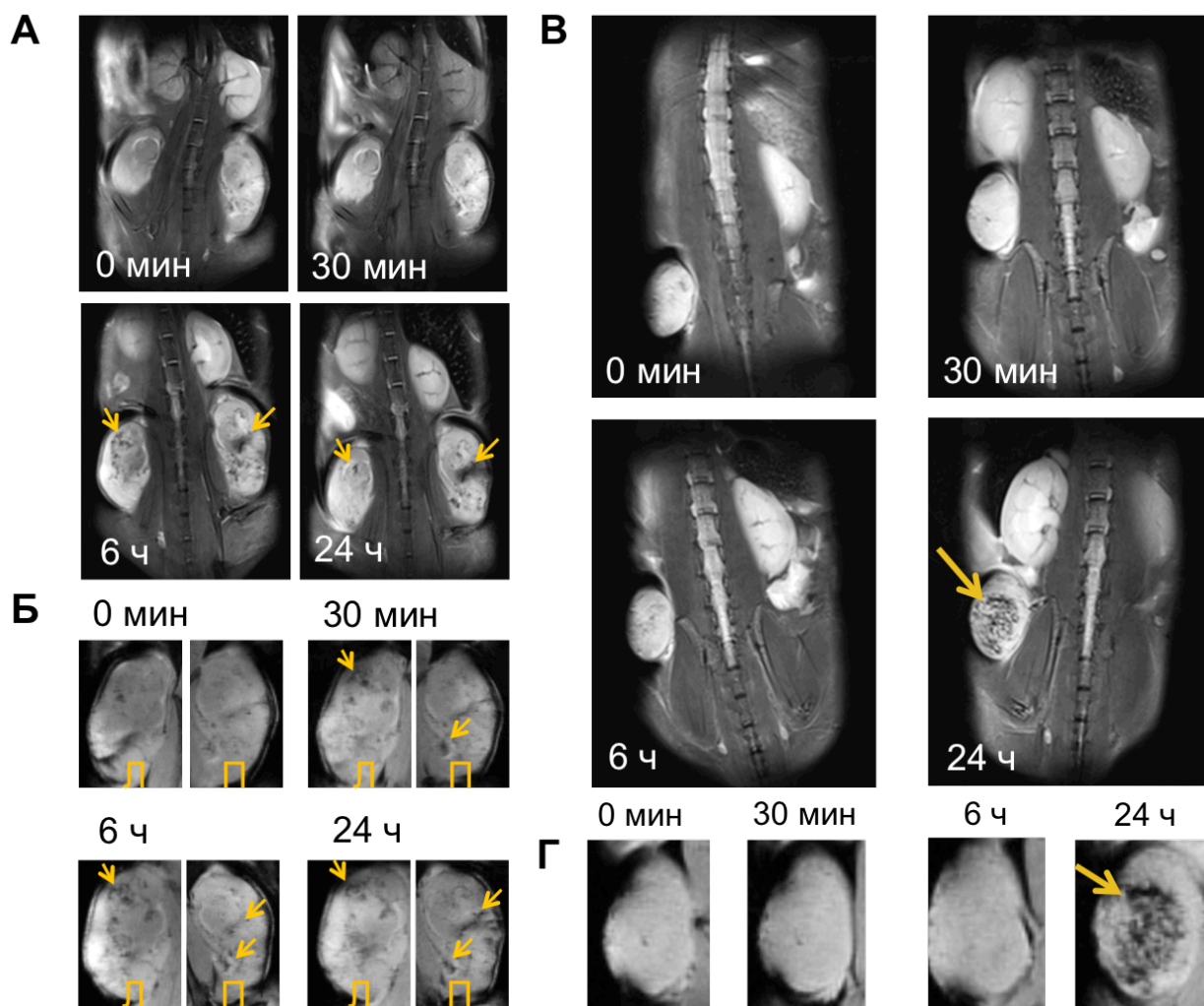


Рисунок 43. НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ как контрастные агенты в *in vivo* МРТ. А) Репрезентативные T_2 -взвешенные изображения мыши BALB/с с привитыми с двух сторон тела опухолями 4Т1, полученные до, а также спустя 30 мин, 6 и 24 ч после внутривенного введения НЧ-PEG ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$); Б) Увеличенные изображения опухолей; В) Репрезентативные T_2 -взвешенные изображения мыши C57 / bl6 с привитой с правой стороны опухолью B16-F10, полученные до, а также спустя 30 мин, 6 и 24 ч после внутривенного введения НЧ-PEG ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$); Г) увеличенные изображения опухоли. Области с повышенной контрастностью опухоли обозначены стрелками

В ходе экспериментов данной работы мышам с привитыми опухолями 4Т1 или B16-F10 внутривенно вводили НЧ-PEG ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$) и проводили визуализацию методом МРТ спустя 30 мин, 6 ч и 24 ч после введения НЧ; соответствующие T_2 -

взвешенные изображения представлены на рисунке 43. Несмотря на то, что через 30 мин после инъекции НЧ накопление последних обнаружено, в основном, в печени, в более поздние моменты времени (6 ч и 24 ч) отчетливо наблюдается усиление контраста опухоли. В соответствии с данными IVIS, пик накопления НЧ-PEG в опухолях также был выявлен спустя 6 ч после введения.

Таким образом, на *in vitro* модели аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 в данной части работы было показано, что в широком диапазоне концентраций НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ не вызывают гемолитический ответ и генерацию АФК, а также эффективно захватываются клетками опухоли. При этом НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ высвобождают загруженный в них противоопухолевый препарат DOX, вызывая дозозависимую токсичность. При введении мышам с привитыми опухолями *in vivo*, НЧ стабильно циркулируют в кровотоке и пассивно накапливаются в опухоли за счет EPR-эффекта на уровне 3% от введенной дозы. Продемонстрировано, что НЧ также высвобождают загруженный препарат (Nile Red) в опухоли, процесс был показан в режиме реального времени при помощи метода ИВМ. Кроме того, НЧ могут быть использованы в качестве контрастных агентов для МРТ-диагностики *in vivo*, что было подтверждено на моделях опухолей 4T1 и B16-F10. В совокупности это делает гибридные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ перспективной платформой для мультимодальной (МРТ и оптической) визуализации, а также тераностики онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы синтеза гибридных НЧ магнетит-золото, которые позволяют получать структуры типа «ядро-оболочка» с размером магнитного ядра 9 нм и толщиной оболочки 8-13 нм, а также структуры типа «гантель» с НЧ магнетита 6-15 нм сферической формы и 25-44 нм октаэдрической формы, эпитаксиально выращенными на НЧ золота диаметром от 3 до 11 нм;

2. Установлено, что в гибридных НЧ по мере увеличения размера НЧ оксида железа происходит переход его структуры от промежуточной между магнетитом и маггемитом до стехиометрического Fe_3O_4 для НЧ типа «гантель» размером 25 нм. Показано, что в этом случае магнитные свойства достигают значений объемного материала, приводя к высоким значениям R_2 -релаксивности НЧ в МРТ (до $612 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) и SLP (до $398 \text{ Вт}\cdot\text{г}^{-1}$) в ГМЧ;

3. Поверхность НЧ со структурой «ядро-оболочка» функционализирована тиол-содержащими лигандами с различной длиной углеводородной цепи, что позволяет проводить иммобилизацию α -химотрипсина. Обнаружено, что действие МП позволяет дистанционно регулировать активность фермента, в частности, приводит к ингибированию от 15 до 64% в зависимости от химической природы лиганда и количества димерных структур «НЧ-фермент-НЧ».

4. Продемонстрировано, что наличие двух функциональных поверхностей в структуре «гантель» обеспечивает возможность селективного ковалентного связывания НЧ Au с флуоресцентной меткой Cy5 и нековалентной загрузки гидрофобного модельного красителя Nile Red или лекарства DOX (86 мкг Nile Red/ 285 мкг DOX на 1000 мкг Fe_3O_4) в полимерной оболочку на НЧ Fe_3O_4 для одновременной визуализации как НЧ-носителей, так лекарственного препарата *in vivo* (процесса его доставки/ высвобождения).

5. В эксперименте *in vivo* показано, что НЧ со структурой «гантель» размером 25 нм при внутривенном введении эффективно накапливаются в опухоли (3% от введенной дозы), что превышает медианное (из литературы) значение для пассивной доставки.

В целом, предложенная система на основе НЧ магнетит-золото обладает высоким потенциалом для тераностики, а также мультимодальной (МРТ и оптической) визуализации опухолей 4T1 и меланомы мыши B16-F10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Estelrich J., Escribano E., Queralt J., et al. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16, № 4. P. 8070–8101.
2. Huang J., Zhong X., Wang L., et al. Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles // *Theranostics*. 2012. Vol. 2, № 1. P. 86–102.
3. Blanco-Andujar C., Walter A., Cotin G., et al. Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia // *Nanomedicine*. 2016. Vol. 11, № 14. P. 1889–1910.
4. Cardoso V.F., Francesko A., Ribeiro C., et al. Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications // *Adv. Healthc. Mater.* 2018. Vol. 7, № 5. P. 1–35.
5. Mosayebi J., Kiyasatfar M., Laurent S. Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications // *Advanced Healthcare Materials*. 2017. Vol. 6. 1700306 p.
6. Leung K.C.-F., Xuan S., Zhu X., et al. Gold and iron oxide hybrid nanocomposite materials // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41, № 5. P. 1911–1928.
7. Nguyen T., Mammeri F., Ammar S. Iron Oxide and Gold Based Magneto-Plasmonic Nanostructures for Medical Applications: A Review // *Nanomaterials*. 2018. Vol. 8, № 3. P. 149.
8. Xu C., Wang B., Sun S. Dumbbell-like Au-Fe₃O₄ nanoparticles for target-specific platinum delivery // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131, № 12. P. 4216–4217.
9. Espinosa A., Bugnet M., Radtke G., et al. Can magneto-plasmonic nanohybrids efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia? // *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, № 45. P. 18872–18877.
10. Zhu J., Lu Y., Li Y., et al. Synthesis of Au-Fe₃O₄ heterostructured nanoparticles for *in vivo* computed tomography and magnetic resonance dual model imaging // *Nanoscale*. 2014. Vol. 6, № 1. P. 199–202.
11. Liu J., Zhang W., Zhang H., et al. A multifunctional nanoprobe based on Au-Fe₃O₄ nanoparticles for multimodal and ultrasensitive detection of cancer cells // *Chem. Commun.* 2013. Vol. 49, № 43. P. 4938–4940.
12. Guardia P., Nitti S., Materia M.E., et al. Gold-iron oxide dimers for magnetic hyperthermia: The key role of chloride ions in the synthesis to boost the heating efficiency // *J. Mater. Chem. B*. 2017. Vol. 5, № 24. P. 4587–4594.
13. Demortière A., Panissod P., Pichon B.P., et al. Size-dependent properties of magnetic iron

- oxide nanocrystals // *Nanoscale*. 2011. Vol. 3, № 1. P. 225–232.
14. Töpfer J., Angermann A. Nanocrystalline magnetite and Mn-Zn ferrite particles via the polyol process: Synthesis and magnetic properties // *Mater. Chem. Phys.* 2011. Vol. 129, № 1–2. P. 337–342.
 15. Verwey E.J.W. Electronic conduction of magnetite (Fe_3O_4) and its transition point at low temperatures // *Nature*. 1939. Vol. 144, № 3642. P. 327–328.
 16. Krishnan K.M., Pakhomov A.B., Bao Y., et al. Nanomagnetism and spin electronics: Materials, microstructure and novel properties // *J. Mater. Sci.* 2006. Vol. 41, № 3. P. 793–815.
 17. Vergés M.A., Costo R., Roca A.G., et al. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain-multidomain limit // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2008. Vol. 41, № 13. P. 134003.
 18. Angelakeris M. Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern theranostics // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 1861, № 6. P. 1642–1651.
 19. Goya G.F., Berquó T.S., Fonseca F.C., et al. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles // *J. Appl. Phys.* 2003. Vol. 94, № 5. P. 3520–3528.
 20. Sawatzky G.A., Van Der Woude F., Morrish A.H. Recoilless-Fraction Ratios for Fe^{57} in Octahedral and Tetrahedral Sites of a Spinel and a Garnet // *Phys. Rev.* 1969. Vol. 183, № 2. P. 383–386.
 21. Voleník K., Seberíni M., Neid J. A Mössbauer and X-ray diffraction study of nonstoichiometry in magnetite // *Czechoslov. J. Phys.* 1975. Vol. 25, № 9. P. 1063–1071.
 22. Cardoso V.F., Irusta S., Navascues N., et al. Comparative study of sol–gel methods for the facile synthesis of tailored magnetic silica spheres // *Mater. Res. Express*. 2016. Vol. 3, № 7. P. 075402.
 23. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media // *IEEE Trans. Magn.* 1981. Vol. 17, № 2. P. 1247–1248.
 24. Reddy L.H., Arias J.L., Nicolas J., et al. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications // *Chem. Rev.* 2012. Vol. 112, № 11. P. 5818–5878.
 25. Shan J., Wang L., Yu H., et al. Recent progress in Fe_3O_4 based magnetic nanoparticles: from synthesis to application // *Mater. Sci. Technol.* 2016. Vol. 4. P. 1–13.
 26. Wu W., Wu Z., Yu T., et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2015. Vol. 16, № 2. P. 023501.

27. Roca A.G., Morales M.P., O'Grady K., et al. Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors // *Nanotechnology*. 2006. Vol. 17, № 11. P. 2783–2788.
28. Frey N.A., Peng S., Cheng K., et al. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage // *Chem. Soc. Rev.* 2009. Vol. 38, № 9. P. 2532–2542.
29. Roca A.G., Morales M.P., Serna C.J. Synthesis of Monodispersed Magnetite Particles From Different Organometallic Precursors // *IEEE Trans. Magn.* 2006. Vol. 42, № 10. P. 3025–3029.
30. Xuan S., Hao L., Jiang W., et al. Preparation of water-soluble magnetite nanocrystals through hydrothermal approach // *J. Magn. Magn. Mater.* 2007. Vol. 308, № 2. P. 210–213.
31. Daou T.J., Pourroy G., Bégin-Colin S., et al. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles // *Chem. Mater.* 2006. Vol. 18, № 18. P. 4399–4404.
32. Wang X., Zhuang J., Peng Q., et al. A general strategy for nanocrystal synthesis // *Nature*. 2005. Vol. 437, № 7055. P. 121–124.
33. Haw C.Y., Mohamed F., Chia C.H., et al. Hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles as MRI contrast agents // *Ceram. Int.* Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l., 2010. Vol. 36, № 4. P. 1417–1422.
34. Liu C., Zou B., Rondinone A.J., et al. Reverse Micelle Synthesis and Characterization of Superparamagnetic MnFe_2O_4 Spinel Ferrite Nanocrystallites // *J. Phys. Chem. B*. 2000. Vol. 104, № 6. P. 1141–1145.
35. Vidal-Vidal J., Rivas J., López-Quintela M.A. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2006. Vol. 288, № 1–3. P. 44–51.
36. Salihov S. V., Ivanenkov Y.A., Krechetov S.P., et al. Recent advances in the synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ core/shell nanoparticles // *J. Magn. Magn. Mater.* 2015. Vol. 394. P. 173–178.
37. Fantechi E., Roca A.G., Sepúlveda B., et al. Seeded Growth Synthesis of $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$ Heterostructured Nanocrystals: Rational Design and Mechanistic Insights // *Chem. Mater.* 2017. Vol. 29, № 9. P. 4022–4035.
38. Lim J., Majetich S.A. Composite magnetic-plasmonic nanoparticles for biomedicine: Manipulation and imaging // *Nano Today*. 2013. Vol. 8, № 1. P. 98–113.
39. Lou L., Yu K., Zhang Z., et al. Dual-mode protein detection based on $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ hybrid nanoparticles // *Nano Res.* 2012. Vol. 5, № 4. P. 272–282.

40. Wang C., Li P., Wang J., et al. Polyethylenimine-interlayered core-shell-satellite 3D magnetic microspheres as versatile SERS substrates // *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, № 44. P. 18694–18707.
41. Huang W.-C., Tsai P.-J., Chen Y.-C. Multifunctional Fe₃O₄@Au Nanoeggs as Photothermal Agents for Selective Killing of Nosocomial and Antibiotic-Resistant Bacteria // *Small*. 2009. Vol. 5, № 1. P. 51–56.
42. Ramos-Tejada M. del M., Viota J.L., Rudzka K., et al. Preparation of multi-functionalized Fe₃O₄/Au nanoparticles for medical purposes // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015. Vol. 128. P. 1–7.
43. Yuan Y., Li S., Xue Y., et al. A Fe₃O₄@Au-based pseudo-homogeneous electrochemical immunosensor for AFP measurement using AFP antibody-GNPs-HRP as detection probe // *Anal. Biochem*. 2017. Vol. 534. P. 56–63.
44. Xie H.Y., Zhen R., Wang B., et al. Fe₃O₄/Au core/shell nanoparticles modified with Ni²⁺-nitrilotriacetic acid specific to histidine-tagged proteins // *J. Phys. Chem. C*. 2010. Vol. 114, № 11. P. 4825–4830.
45. Lyon J.L., Fleming D.A., Stone M.B., et al. Synthesis of Fe oxide Core/Au shell nanoparticles by iterative hydroxylamine seeding // *Nano Lett*. 2004. Vol. 4, № 4. P. 719–723.
46. Wang L., Luo J., Fan Q., et al. Monodispersed core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles // *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109, № 46. P. 21593–21601.
47. Lo C.K., Xiao D., Choi M.M.F. Homocysteine-protected gold-coated magnetic nanoparticles: synthesis and characterisation // *J. Mater. Chem*. 2007. Vol. 17, № 23. P. 2418.
48. Zhou T., Wu B., Xing D. Bio-modified Fe₃O₄ core/Au shell nanoparticles for targeting and multimodal imaging of cancer cells // *J. Mater. Chem*. 2012. Vol. 22, № 2. P. 470–477.
49. Baskakov A.O., Solov'eva A.Y., Ioni Y. V., et al. Magnetic and interface properties of the core-shell Fe₃O₄/Au nanocomposites // *Appl. Surf. Sci*. 2017. Vol. 422. P. 638–644.
50. Abdulla-Al-Mamun M., Kusumoto Y., Zannat T., et al. Au-ultrathin functionalized core-shell (Fe₃O₄@Au) monodispersed nanocubes for a combination of magnetic/plasmonic photothermal cancer cell killing // *RSC Adv*. 2013. Vol. 3, № 21. P. 7816–7827.
51. Wang C., Xu C., Zeng H., et al. Recent progress in syntheses and applications of dumbbell-like nanoparticles // *Adv. Mater*. 2009. Vol. 21, № 30. P. 3045–3052.
52. Reguera J., Kim H., Stellacci F. Advances in Janus Nanoparticles // *Chim. Int. J. Chem*. 2013. Vol. 67, № 11. P. 811–818.

53. Kirui D.K., Rey D.A., Batt C.A. Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging // *Nanotechnology*. 2010. Vol. 21, № 10. P. 105105.
54. Umut E., Pineider F., Arosio P., et al. Magnetic, optical and relaxometric properties of organically coated gold-magnetite (Au-Fe₃O₄) hybrid nanoparticles for potential use in biomedical applications // *J. Magn. Magn. Mater.* Elsevier, 2012. Vol. 324, № 15. P. 2373–2379.
55. Li L., Du Y.M., Mak K.Y., et al. Novel Hybrid Au/Fe₃O₄ Magnetic Octahedron-like Nanoparticles with Tunable Size // *IEEE Trans. Magn.* 2014. Vol. 50, № 1. P. 1–5.
56. Yu H., Chen M., Rice P.M., et al. Dumbbell-like Bifunctional Au–Fe₃O₄ Nanoparticles // *Nano Lett.* 2005. Vol. 5, № 2. P. 379–382.
57. León Félix L., Coaquira J.A.H., Martínez M.A.R., et al. Structural and magnetic properties of core-shell Au/Fe₃O₄ nanoparticles // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 41732.
58. Liu S., Guo S., Sun S., et al. Dumbbell-like Au-Fe₃O₄ nanoparticles: a new nanostructure for supercapacitors // *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 7, № 11. P. 4890–4893.
59. Lin F.H., Peng H.H., Yang Y.H., et al. Size and morphological effect of Au-Fe₃O₄ heterostructures on magnetic resonance imaging // *J. Nanoparticle Res.* 2013. Vol. 15, № 12. P. 2139.
60. Jiang G., Huang Y., Zhang S., et al. Controlled synthesis of Au–Fe heterodimer nanoparticles and their conversion into Au–Fe₃O₄ heterostructured nanoparticles // *Nanoscale*. 2016. Vol. 8, № 41. P. 17947–17952.
61. Jin C., Qu Y., Wang M., et al. Aqueous Solution-Based Fe₃O₄ Seed-Mediated Route to Hydrophilic Fe₃O₄-Au Janus Nanoparticles // *Langmuir*. 2016. Vol. 32, № 18. P. 4595–4601.
62. Ni D., Bu W., Ehlerding E.B., et al. Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents // *Chem. Soc. Rev.* Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 46, № 23. P. 7438–7468.
63. Sun C., Lee J., Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. Vol. 60, № 11. P. 1252–1265.
64. Zhu L., Zhou Z., Mao H., et al. Magnetic nanoparticles for precision oncology: Theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy // *Nanomedicine*. 2017. Vol. 12, № 1. P. 73–87.
65. Revia R.A., Zhang M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: Recent advances // *Mater. Today*. Elsevier Ltd., 2016. Vol. 19, № 3. P. 157–168.

66. Golovin Y.I., Gribovsky S.L., Golovin D.Y., et al. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields // *J. Control. Release*. 2015. Vol. 219. P. 43–60.
67. Gilchrist R.K., Medal R., Shorey W.D., et al. Selective inductive heating of lymph nodes // *Ann. Surg.* 1957. Vol. 146, № 4. P. 596–606.
68. Kumar C.S.S.R., Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V.*, 2011. Vol. 63, № 9. P. 789–808.
69. Gobbo O.L., Sjaastad K., Radomski M.W., et al. Magnetic nanoparticles in cancer theranostics // *Theranostics*. 2015. Vol. 5, № 11. P. 1249–1263.
70. Bakoglidis K.D., Simeonidis K., Sakellari D., et al. Size-Dependent Mechanisms in AC Magnetic Hyperthermia Response of Iron-Oxide Nanoparticles // *IEEE Trans. Magn.* 2012. Vol. 48, № 4. P. 1320–1323.
71. Lee D.E., Koo H., Sun I.C., et al. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41, № 7. P. 2656–2672.
72. Pelaz B., Alexiou C., Alvarez-Puebla R.A., et al. Diverse Applications of Nanomedicine // *ACS Nano*. 2017. Vol. 11, № 3. P. 2313–2381.
73. Yu M.K., Park J., Jon S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy // *Theranostics*. 2012. Vol. 2, № 1. P. 3–44.
74. De Crozals G., Bonnet R., Farre C., et al. Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide // *Nano Today*. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 11, № 4. P. 435–463.
75. Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // *Nat. Rev. Mater.* 2016. Vol. 1, № 5. P. 16014.
76. Overchuk M., Zheng G. Overcoming obstacles in the tumor microenvironment: Recent advancements in nanoparticle delivery for cancer theranostics // *Biomaterials*. 2018. Vol. 156. P. 217–237.
77. Kang T., Li F., Baik S., et al. Surface design of magnetic nanoparticles for stimuli-responsive cancer imaging and therapy // *Biomaterials*. 2017. Vol. 136. P. 98–114.
78. Lee S., Kwon I.C.K.C., Kim K. Multifunctional Nanoparticles for Cancer Theragnosis // *Nanoplatfrom-Based Molecular Imaging* / ed. Chen X. Xiaoyuan Chen, 2011. P. 541–563.
79. Yoo D., Lee J.H., Shin T.H., et al. Theranostic magnetic nanoparticles // *Acc. Chem. Res.* 2011. Vol. 44, № 10. P. 863–874.
80. Florence A.T. “Targeting” nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers // *J. Control. Release*. 2012. Vol. 164, № 2. P. 115–124.

81. Taurin S., Nehoff H., Greish K. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? // *J. Control. Release*. 2012. Vol. 164, № 3. P. 265–275.
82. Huang H., Lovell J.F. Advanced Functional Nanomaterials for Theranostics // *Adv. Funct. Mater.* 2017. Vol. 27, № 2.
83. Sumer B., Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer // *Nanomedicine*. 2008. Vol. 3, № 2. P. 137–140.
84. Lammers T., Aime S., Hennink W.E., et al. Theranostic Nanomedicine // *Acc. Chem. Res.* 2011. Vol. 44, № 10. P. 1029–1038.
85. Mura S., Couvreur P. Nanotheranostics for personalized medicine // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012. Vol. 64, № 13. P. 1394–1416.
86. Lammers T., Subr V., Ulbrich K., et al. Polymeric nanomedicines for image-guided drug delivery and tumor-targeted combination therapy // *Nano Today*. 2010. Vol. 5, № 3. P. 197–212.
87. Louie A. Multimodality Imaging Probes: Design and Challenges // *Chem. Rev.* 2010. Vol. 110, № 5. P. 3146–3195.
88. Weissleder R., Pittet M.J. Imaging in the era of molecular oncology // *Nature*. 2008. Vol. 452, № 7187. P. 580–589.
89. Zhu Y., Zhou Q., Mu K., et al. Glioma-targeting micelles for optical/magnetic resonance dual-mode imaging // *Int. J. Nanomedicine*. 2015. Vol. 10. P. 1805–1818.
90. Cha E.-J., Jang E.S., Sun I.-C., et al. Development of MRI/NIRF ‘activatable’ multimodal imaging probe based on iron oxide nanoparticles // *J. Control. Release*. 2011. Vol. 155, № 2. P. 152–158.
91. Veisheh O., Sun C., Fang C., et al. Specific Targeting of Brain Tumors with an Optical/Magnetic Resonance Imaging Nanoprobe across the Blood-Brain Barrier // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, № 15. P. 6200–6207.
92. *Single-molecule Studies of Proteins* / ed. Oberhauser A.F. New York, NY: Springer New York, 2013.
93. *Handbook of Molecular Force Spectroscopy* / ed. Noy A. Boston, MA: Springer US, 2008.
94. *Single Molecule Dynamics in Life Science* / ed. Yanagida T., Ishii Y. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
95. Puchner E.M., Gaub H.E. Single-Molecule Mechanoenzymatics // *Annu. Rev. Biophys.* 2012. Vol. 41, № 1. P. 497–518.
96. Popa I., Kosuri P., Alegre-Cebollada J., et al. Force dependency of biochemical reactions

- measured by single-molecule force-clamp spectroscopy // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 7. P. 1261–1276.
97. Rios C., Longo J., Zahouani S., et al. A new biomimetic route to engineer enzymatically active mechano-responsive materials // *Chem. Commun.* 2015. Vol. 51, № 26. P. 5622–5625.
 98. Golovin Y.I., Gribanovskii S.L., Golovin D.Y., et al. Single-domain magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field as mediators of local deformation of the surrounding macromolecules // *Phys. Solid State.* 2014. Vol. 56, № 7. P. 1342–1351.
 99. Huang H., Kamm R.D., Lee R.T. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2004. Vol. 287, № 1. P. C1–C11.
 100. Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells // *Acta Biomater.* 2007. Vol. 3, № 4. P. 413–438.
 101. Dobson J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles // *Nat. Nanotechnol.* 2008. Vol. 3, № 3. P. 139–143.
 102. Kim D.H., Rozhkova E.A., Ulasov I. V., et al. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction // *Nat. Mater.* Nature Publishing Group, 2010. Vol. 9, № 2. P. 165–171.
 103. Klyachko N.L., Sokolsky-Papkov M., Pothayee N., et al. Changing the enzyme reaction rate in magnetic nanosuspensions by a non-heating magnetic field // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2012. Vol. 51, № 48. P. 12016–12019.
 104. Golovin Y.I., Klyachko N.L., Majouga A.G., et al. Theranostic multimodal potential of magnetic nanoparticles actuated by non-heating low frequency magnetic field in the new-generation nanomedicine // *J. Nanoparticle Res. Journal of Nanoparticle Research*, 2017. Vol. 19, № 2. P. 63.
 105. Golovin Y.I., Gribanovsky S.L., Golovin D.Y., et al. The dynamics of magnetic nanoparticles exposed to non-heating alternating magnetic field in biochemical applications: theoretical study // *J. Nanoparticle Res. Journal of Nanoparticle Research*, 2017. Vol. 19, № 2. P. 59.
 106. Golovin Y.I., Klyachko N.L., Golovin D.Y., et al. A new approach to the control of biochemical reactions in a magnetic nanosuspension using a low-frequency magnetic field // *Tech. Phys. Lett.* 2013. Vol. 39, № 3. P. 240–243.
 107. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2003. Vol. 36, № 13. P. R167–R181.
 108. Master A.M., Williams P.N., Pothayee N., et al. Remote actuation of magnetic nanoparticles for cancer cell selective treatment through cytoskeletal disruption // *Sci.*

- Rep. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6. P. 1–13.
109. Vitol E.A., Novosad V., Rozhkova E.A. Microfabricated magnetic structures for future medicine: from sensors to cell actuators // *Nanomedicine*. 2012. Vol. 7, № 10. P. 1611–1624.
 110. Joshi H.M., Lin Y.P., Aslam M., et al. Effects of Shape and Size of Cobalt Ferrite Nanostructures on Their MRI Contrast and Thermal Activation // *J. Phys. Chem. C*. 2009. Vol. 113, № 41. P. 17761–17767.
 111. Lee J.-H., Huh Y.-M., Jun Y., et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging // *Nat. Med.* 2007. Vol. 13, № 1. P. 95–99.
 112. Smolensky E.D., Park H.Y.E., Zhou Y., et al. Scaling laws at the nanosize: The effect of particle size and shape on the magnetism and relaxivity of iron oxide nanoparticle contrast agents // *J. Mater. Chem. B*. 2013. Vol. 1, № 22. P. 2818–2828.
 113. Pösel E., Kloust H., Tromsdorf U., et al. Relaxivity Optimization of a PEGylated Iron-Oxide-Based Negative Magnetic Resonance Contrast Agent for T₂-Weighted Spin–Echo Imaging // *ACS Nano*. 2012. Vol. 6, № 2. P. 1619–1624.
 114. Wang W., Pacheco V., Krause H.-J., et al. Size and Compositional Effects on Contrast Efficiency of Functionalized Superparamagnetic Nanoparticles at Ultralow and Ultrahigh Magnetic Fields // *J. Phys. Chem. C*. 2012. Vol. 116, № 33. P. 17880–17884.
 115. Lee N., Choi Y., Lee Y., et al. Water-dispersible ferrimagnetic iron oxide nanocubes with extremely high r₂ relaxivity for highly sensitive *in vivo* MRI of tumors // *Nano Lett.* 2012. Vol. 12, № 6. P. 3127–3131.
 116. Zhao Z., Zhou Z., Bao J., et al. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T₂ contrast agents for magnetic resonance imaging // *Nat. Commun.* 2013. Vol. 4. P. 2266.
 117. Roca A.G., Veintemillas-Verdaguer S., Port M., et al. Effect of Nanoparticle and Aggregate Size on the Relaxometric Properties of MR Contrast Agents Based on High Quality Magnetite Nanoparticles // *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113, № 19. P. 7033–7039.
 118. Jun Y., Huh Y.-M., Choi J., et al. Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 16. P. 5732–5733.
 119. Paquet C., de Haan H.W., Leek D.M., et al. Clusters of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Encapsulated in a Hydrogel: A Particle Architecture Generating a Synergistic Enhancement of the T₂ Relaxation // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 4. P. 3104–3112.
 120. Huang J., Bu L., Xie J., et al. Effects of Nanoparticle Size on Cellular Uptake and Liver

- MRI with Polyvinylpyrrolidone-Coated Iron Oxide Nanoparticles // ACS Nano. 2010. Vol. 4, № 12. P. 7151–7160.
121. Jang J., Nah H., Lee J.-H., et al. Critical Enhancements of MRI Contrast and Hyperthermic Effects by Dopant-Controlled Magnetic Nanoparticles // Angew. Chemie Int. Ed. 2009. Vol. 48, № 7. P. 1234–1238.
 122. Duan H., Kuang M., Wang X., et al. Reexamining the Effects of Particle Size and Surface Chemistry on the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals: New Insights into Spin Disorder and Proton Relaxivity // J. Phys. Chem. C. 2008. Vol. 112, № 22. P. 8127–8131.
 123. LaConte L.E.W., Nitin N., Zurkiya O., et al. Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R_2 relaxivity // J. Magn. Reson. Imaging. 2007. Vol. 26, № 6. P. 1634–1641.
 124. Pinho S.L.C., Laurent S., Rocha J., et al. Relaxometric Studies of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ Core Shell Nanoparticles: When the Coating Matters // J. Phys. Chem. C. 2012. Vol. 116, № 3. P. 2285–2291.
 125. Liu X.L., Fan H.M., Yi J.B., et al. Optimization of surface coating on Fe_3O_4 nanoparticles for high performance magnetic hyperthermia agents // J. Mater. Chem. 2012. Vol. 22, № 17. P. 8235–8244.
 126. Fortin J.-P., Wilhelm C., Servais J., et al. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 9. P. 2628–2635.
 127. Guardia P., Di Corato R., Lartigue L., et al. Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 4. P. 3080–3091.
 128. Basly B., Popa G., Fleutot S., et al. Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents // Dalt. Trans. 2013. Vol. 42, № 6. P. 2146–2157.
 129. Gazeau F., Lévy M., Wilhelm C. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy // Nanomedicine. 2008. Vol. 3, № 6. P. 831–844.
 130. Hergt R., Hiergeist R., Zeisberger M., et al. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools // J. Magn. Magn. Mater. 2005. Vol. 293, № 1. P. 80–86.
 131. Sathya A., Guardia P., Brescia R., et al. $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ Nanocubes for Theranostic Applications: Effect of Cobalt Content and Particle Size // Chem. Mater. 2016. Vol. 28, № 6. P. 1769–1780.
 132. Cullity B.D., Graham C.D. Introduction To Magnetic Materials. John Wiley & Sons,

2011.

133. Habib A.H., Ondeck C.L., Chaudhary P., et al. Evaluation of iron-cobalt/ferrite core-shell nanoparticles for cancer thermotherapy // *J. Appl. Phys.* 2008. Vol. 103, № 7. P. 07A307.
134. Mehdaoui B., Tan R.P., Meffre A., et al. Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results // *Phys. Rev. B.* 2013. Vol. 87, № 17. P. 174419.
135. Lartigue L., Hugounenq P., Alloyeau D., et al. Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents // *ACS Nano.* 2012. Vol. 6, № 12. P. 10935–10949.
136. Blanco-Andujar C., Ortega D., Southern P., et al. High performance multi-core iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia: microwave synthesis, and the role of core-to-core interactions // *Nanoscale.* 2015. Vol. 7, № 5. P. 1768–1775.
137. de la Presa P., Luengo Y., Multigner M., et al. Study of Heating Efficiency as a Function of Concentration, Size, and Applied Field in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles // *J. Phys. Chem. C.* 2012. Vol. 116, № 48. P. 25602–25610.
138. Dennis C.L., Jackson A.J., Borchers J.A., et al. Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia // *Nanotechnology.* 2009. Vol. 20, № 39. P. 395103.
139. Martinez-Boubeta C., Simeonidis K., Makridis A., et al. Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3, № 1. P. 1652.
140. Di Corato R., Espinosa A., Lartigue L., et al. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs // *Biomaterials.* 2014. Vol. 35, № 24. P. 6400–6411.
141. Creixell M., Bohórquez A.C., Torres-Lugo M., et al. EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a Perceptible Temperature Rise // *ACS Nano.* 2011. Vol. 5, № 9. P. 7124–7129.
142. Erathodiyil N., Ying J.Y. Functionalization of Inorganic Nanoparticles for Bioimaging Applications // *Acc. Chem. Res.* 2011. Vol. 44, № 10. P. 925–935.
143. Muthiah M., Park I.-K., Cho C.-S. Nanoparticle-mediated delivery of therapeutic genes: focus on miRNA therapeutics // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013. Vol. 10, № 9. P. 1259–1273.
144. Chung T.-H., Hsieh C.-C., Hsiao J.-K., et al. Dextran-coated iron oxide nanoparticles turn protumor mesenchymal stem cells (MSCs) into antitumor MSCs // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6, № 51. P. 45553–45561.

145. Blin T., Kakinen A., Pilkington E.H., et al. Synthesis and in vitro properties of iron oxide nanoparticles grafted with brushed phosphorylcholine and polyethylene glycol // *Polym. Chem.* 2016. Vol. 7, № 10. P. 1931–1944.
146. Zhu Y., Tao C. DNA-capped Fe₃O₄/SiO₂ magnetic mesoporous silica nanoparticles for potential controlled drug release and hyperthermia // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5, № 29. P. 22365–22372.
147. Arruebo M., Fernández-Pacheco R., Ibarra M.R., et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery // *Nano Today.* 2007. Vol. 2, № 3. P. 22–32.
148. Lee J.E., Lee N., Kim T., et al. Multifunctional Mesoporous Silica Nanocomposite Nanoparticles for Theranostic Applications // *Acc. Chem. Res.* 2011. Vol. 44, № 10. P. 893–902.
149. Kim J., Kim H.S., Lee N., et al. Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2008. Vol. 47, № 44. P. 8438–8441.
150. Moraes Silva S., Tavallaie R., Sandiford L., et al. Gold coated magnetic nanoparticles: From preparation to surface modification for analytical and biomedical applications // *Chem. Commun.* 2016. Vol. 52, № 48. P. 7528–7540.
151. Belyanina I. V., Zamay T.N., Zamay G.S., et al. In vivo cancer cells elimination guided by aptamer-functionalized gold-coated magnetic nanoparticles and controlled with low frequency alternating magnetic field // *Theranostics.* 2017. Vol. 7, № 11. P. 2956–2967.
152. Soenen S.J., Rivera-Gil P., Montenegro J.M., et al. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation // *Nano Today.* 2011. Vol. 6, № 5. P. 446–465.
153. Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity // *Small.* 2005. Vol. 1, № 3. P. 325–327.
154. Pan Y., Neuss S., Leifert A., et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles // *Small.* 2007. Vol. 3, № 11. P. 1941–1949.
155. Patra H.K., Banerjee S., Chaudhuri U., et al. Cell selective response to gold nanoparticles // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2007. Vol. 3, № 2. P. 111–119.
156. Chao X., Shi F., Zhao Y.-Y., et al. Cytotoxicity of Fe₃O₄/Au composite nanoparticles loaded with doxorubicin combined with magnetic field. // *Pharmazie.* 2010. Vol. 65, № 7. P. 500–504.
157. Salado J., Insausti M., Lezama L., et al. Functionalized Fe₃O₄@Au superparamagnetic nanoparticles: In vitro bioactivity // *Nanotechnology.* 2012. Vol. 23, № 31. P. 1–10.

158. Li Y., Liu, Zhong Y., et al. Biocompatibility of Fe₃O₄@Au composite magnetic nanoparticles in vitro and in vivo // *Int. J. Nanomedicine*. 2011. P. 2805.
159. Xu C., Xie J., Ho D., et al. Au–Fe₃O₄ Dumbbell Nanoparticles as Dual-Functional Probes // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2008. Vol. 47, № 1. P. 173–176.
160. Menichetti L., Manzoni L., Paduano L., et al. Iron oxide-gold core-shell nanoparticles as multimodal imaging contrast agent // *IEEE Sens. J.* 2013. Vol. 13, № 6. P. 2341–2347.
161. Ahmad T., Bae H., Rhee I., et al. Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles as a T₂ Contrast Agent in Magnetic Resonance Imaging // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2012. Vol. 12, № 7. P. 5132–5137.
162. Li J., Zheng L., Cai H., et al. Facile One-Pot Synthesis of Fe₃O₄@Au Composite Nanoparticles for Dual-Mode MR/CT Imaging Applications // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2013. Vol. 5, № 20. P. 10357–10366.
163. Reguera J., Jiménez De Aberasturi D., Henriksen-Lacey M., et al. Janus plasmonic-magnetic gold-iron oxide nanoparticles as contrast agents for multimodal imaging // *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 9, № 27. P. 9467–9480.
164. Yang M., Cheng K., Qi S., et al. Affibody modified and radiolabeled gold-Iron oxide hetero-nanostructures for tumor PET, optical and MR imaging // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 34, № 11. P. 2796–2806.
165. Mohammad F., Balaji G., Weber A., et al. Influence of Gold Nanoshell on Hyperthermia of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs). // *J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces*. 2010. Vol. 114, № 45. P. 19194–19201.
166. Kakwere H., Materia M.E., Curcio A., et al. Dually responsive gold-iron oxide heterodimers: Merging stimuli-responsive surface properties with intrinsic inorganic material features // *Nanoscale*. 2018. Vol. 10, № 8. P. 3930–3944.
167. Larson T.A., Bankson J., Aaron J., et al. Hybrid plasmonic magnetic nanoparticles as molecular specific agents for MRI/optical imaging and photothermal therapy of cancer cells // *Nanotechnology*. 2007. Vol. 18, № 32. P. 325101.
168. Azhdarzadeh M., Atyabi F., Saei A.A., et al. Theranostic MUC-1 aptamer targeted gold coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging and photothermal therapy of colon cancer // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016. Vol. 143. P. 224–232.
169. Ren J., Wang F., Wei G., et al. MRI of prostate cancer antigen expression for diagnosis and Immunotherapy // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 6. P. 1–10.
170. Maniglio D., Benetti F., Minati L., et al. Theranostic gold-magnetite hybrid nanoparticles for MRI-guided radiosensitization // *Nanotechnology*. IOP Publishing, 2018. Vol. 29, №

31. P. 315101.
171. Pineider F., de Julián Fernández C., Videtta V., et al. Spin-Polarization Transfer in Colloidal Magnetic-Plasmonic Au/Iron Oxide Hetero-nanocrystals // *ACS Nano*. 2013. Vol. 7, № 1. P. 857–866.
 172. Orlando T., Capozzi A., Umut E., et al. Spin dynamics in hybrid iron oxide-gold nanostructures // *J. Phys. Chem. C*. 2015. Vol. 119, № 2. P. 1224–1233.
 173. Lim J., Eggeman A., Lanni F., et al. Synthesis and Single-Particle Optical Detection of Low-Polydispersity Plasmonic-Superparamagnetic Nanoparticles // *Adv. Mater.* 2008. Vol. 20, № 9. P. 1721–1726.
 174. Goon I.Y., Lai L.M.H., Lim M., et al. Fabrication and dispersion of gold-shell-protected magnetite nanoparticles: Systematic control using polyethyleneimine // *Chem. Mater.* 2009. Vol. 21, № 4. P. 673–681.
 175. Fazal S., Paul-Prasanth B., Nair S. V., et al. Theranostic Iron Oxide/Gold Ion Nanoprobes for MR Imaging and Noninvasive RF Hyperthermia // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. Vol. 9, № 34. P. 28260–28272.
 176. Erofeev A., Gorelkin P., Garanina A., et al. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 7462.
 177. Woo K., Hong J., Choi S., et al. Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles // *Chem. Mater.* 2004. Vol. 16, № 14. P. 2814–2818.
 178. Lu A.H., Salabas E.L., Schüth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2007. Vol. 46, № 8. P. 1222–1244.
 179. Liu X., Atwater M., Wang J., et al. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2007. Vol. 58, № 1. P. 3–7.
 180. Wei Y., Klajn R., Pinchuk A.O., et al. Synthesis, Shape Control, and Optical Properties of Hybrid Au/Fe₃O₄ “Nanoflowers” // *Small*. 2008. Vol. 4, № 10. P. 1635–1639.
 181. Jin Y., Jia C., Huang S.W., et al. Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2010. Vol. 1, № 4. P. 1–8.
 182. De Bernardo S., Weigle M., Toome V., et al. Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1974. Vol. 163, № 1. P. 390–399.
 183. Heinemann L., Simpson G.R., Boxall A., et al. Synergistic effects of oncolytic reovirus and docetaxel chemotherapy in prostate cancer // *BMC Cancer*. 2011. Vol. 11. P. 221.
 184. Wojtala A., Bonora M., Malinska D., et al. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry // *Methods Enzym.* 2014. Vol. 542. P. 243–

185. Fornaguera C., Calderó G., Mitjans M., et al. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies // *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, № 14. P. 6045–6058.
186. Naumenko V., Jenne C., Mahoney D.J. Intravital Microscopy for Imaging the Tumor Microenvironment in Live Mice // *Methods Mol. Biol.* 2016. Vol. 1458. P. 217–230.
187. Jolivet J.-P., Tronc E. Interfacial electron transfer in colloidal spinel iron oxide. Conversion of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ in aqueous medium // *J. Colloid Interface Sci.* 1988. Vol. 125, № 2. P. 688–701.
188. Hien Pham T.T., Cao C., Sim S.J. Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations // *J. Magn. Magn. Mater.* 2008. Vol. 320, № 15. P. 2049–2055.
189. Zhai Y., Jin L., Wang P., et al. Dual-functional Au- Fe_3O_4 dumbbell nanoparticles for sensitive and selective turn-on fluorescent detection of cyanide based on the inner filter effect // *Chem. Commun.* 2011. Vol. 47, № 29. P. 8268–8270.
190. Brown T.L., Jemay J.H.E. *Chemistry: The Central Science*. Englewood, New Jersey: Prentice Hall Inc, 1985.
191. Blaney L. Magnetite (Fe_3O_4): Properties, Synthesis, and Applications // *Lehigh Rev.* 2007. Vol. 15. P. 5.
192. Robinson I., Tung L.D., Maenosono S., et al. Synthesis of core-shell gold coated magnetic nanoparticles and their interaction with thiolated DNA // *Nanoscale*. 2010. Vol. 2, № 12. P. 2624–2630.
193. Salikhov S. V., Savchenko A.G., Grebennikov I.S., et al. Phase composition and structure of iron oxide nanopowders prepared by chemical means // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2015. Vol. 79, № 9. P. 1106–1112.
194. Sorenson T.A., Morton S.A., Waddill G.D., et al. Epitaxial Electrodeposition of Fe_3O_4 Thin Films on the Low-Index Planes of Gold // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, № 25. P. 7604–7609.
195. Wang C., Yin H., Dai S., et al. A General Approach to Noble Metal–Metal Oxide Dumbbell Nanoparticles and Their Catalytic Application for CO Oxidation // *Chem. Mater.* 2010. Vol. 22, № 10. P. 3277–3282.
196. Park J., Lee E., Hwang N.-M., et al. One-Nanometer-Scale Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Magnetic Iron Oxide Nanoparticles // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2005. Vol. 44, № 19. P. 2872–2877.
197. Omelyanchik A., Levada E., Ding J., et al. Design of Conductive Microwire Systems for

- Manipulation of Biological Cells // IEEE Trans. Magn. 2018. Vol. 54, № 6. P. 1–5.
198. Aragón R. Magnetization and exchange in nonstoichiometric magnetite // Phys. Rev. B. 1992. Vol. 46, № 9. P. 5328–5333.
 199. Santoyo Salazar J., Perez L., de Abril O., et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10–40 nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties // Chem. Mater. 2011. Vol. 23, № 6. P. 1379–1386.
 200. Kharisov B.I., Dias H.V.R., Kharissova O. V., et al. Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-Aqueous solvents: Recent trends // RSC Adv. 2014. Vol. 4, № 85. P. 45354–45381.
 201. Nicolas J., Mura S., Brambilla D., et al. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery // Chem. Soc. Rev. 2013. Vol. 42, № 3. P. 1147–1235.
 202. Efremova M. V., Naumenko V.A., Spasova M., et al. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics // Sci. Rep. 2018. Vol. 8, № 1. P. 11295.
 203. Choi D., Han A., Park J.P., et al. Fabrication of $Mn_xFe_{1-x}O$ colloidal solid solution as a dual magnetic-resonance-contrast agent // Small. 2009. Vol. 5, № 5. P. 571–573.
 204. Li W., Tutton S., Vu A.T., et al. First-pass contrast-enhanced magnetic resonance angiography in humans using ferumoxytol, a novel ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)-based blood pool agent // J. Magn. Reson. Imaging. 2005. Vol. 21, № 1. P. 46–52.
 205. Myrovali E., Maniotis N., Makridis A., et al. Arrangement at the nanoscale: Effect on magnetic particle hyperthermia // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 1–11.
 206. Zhi-Jian Chen, Broaddus W.C., Viswanathan R.R., et al. Intraparenchymal drug delivery via positive-pressure infusion: experimental and modeling studies of poroelasticity in brain phantom gels // IEEE Trans. Biomed. Eng. 2002. Vol. 49, № 2. P. 85–96.
 207. Salloum M., Ma R.H., Weeks D., et al. Controlling nanoparticle delivery in magnetic nanoparticle hyperthermia for cancer treatment: Experimental study in agarose gel // Int. J. Hyperth. 2008. Vol. 24, № 4. P. 337–345.
 208. Kim D., Yu M.K., Lee T.S., et al. Amphiphilic polymer-coated hybrid nanoparticles as CT/MRI dual contrast agents // Nanotechnology. 2011. Vol. 22, № 15.
 209. Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. // Apoptosis. 2000. Vol. 5, № 5. P. 415–418.
 210. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // Free Radic. Biol. Med. 2010. Vol. 48, № 6. P. 749–762.
 211. Sadhukha T., Wiedmann T.S., Panyam J. Enhancing therapeutic efficacy through

- designed aggregation of nanoparticles // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, № 27. P. 7860–7869.
212. Asín L., Ibarra M.R., Tres A., et al. Controlled Cell Death by Magnetic Hyperthermia: Effects of Exposure Time, Field Amplitude, and Nanoparticle Concentration // *Pharm. Res.* 2012. Vol. 29, № 5. P. 1319–1327.
 213. Sanchez C., El Hajj Diab D., Connord V., et al. Targeting a G-Protein-Coupled Receptor Overexpressed in Endocrine Tumors by Magnetic Nanoparticles To Induce Cell Death // *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, № 2. P. 1350–1363.
 214. Oh Y., Lee N., Kang H.W., et al. In vitro study on apoptotic cell death by effective magnetic hyperthermia with chitosan-coated MnFe_2O_4 // *Nanotechnology*. 2016. Vol. 27, № 11. P. 115101.
 215. Estevanato L.L., Da Silva J.R., Falqueiro A.M., et al. Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and selol for breast tumor treatment: in vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy // *Int. J. Nanomedicine*. 2012. Vol. 7. P. 5287–5299.
 216. Sasikala A.R.K., Unnithan A.R., Yun Y.-H., et al. An implantable smart magnetic nanofiber device for endoscopic hyperthermia treatment and tumor-triggered controlled drug release // *Acta Biomater.* 2016. Vol. 31. P. 122–133.
 217. Klibanov A., Samokhin G.P., Martinek K., et al. Enzymatic mechanochemistry: a new approach to studying the mechanism of enzyme action // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1976. Vol. 438. P. 1–12.
 218. Majouga A., Sokolsky-Papkov M., Kuznetsov A., et al. Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: Synthesis, purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015. Vol. 125. P. 104–109.
 219. Головин Ю.И., Жигачев А.О., Ефремова М.В., et al. Пути и методы управления биомолекулярными структурами с помощью магнитных наночастиц, активируемых переменным магнитным полем // *Российские Нанотехнологии*. 2018. Т. 13, № 5–6. С. 82–90.
 220. Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Мажуга А.Г., et al. Новые подходы к нанотераностике: полифункциональные магнитные наночастицы, активируемые негреющим низкочастотным магнитным полем, управляют биохимической системой с молекулярной локальностью и селективностью // *Российские Нанотехнологии*. 2018. Т. 13, № 5–6. С. 3–25.
 221. Wesółowska O., Krokoszyńska I., Krowarsch D., et al. Enhancement of chymotrypsin-inhibitor/substrate interactions by 3M NaCl // *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. Vol. 1545,

- № 1–2. P. 78–85.
222. Castillo-Yáñez F.J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F.L., et al. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) // *Food Chem.* 2006. Vol. 99, № 2. P. 252–259.
 223. *Relaxation Phenomena* / ed. Haase W., Wróbel S. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003.
 224. Rudakovskaya P.G., Lebedev D.N., Efremova M.V., et al. Core–shell magnetite–gold nanoparticles: Preparing and functionalization by chymotrypsin // *Nanotechnologies Russ.* 2016. Vol. 11, № 3–4.
 225. Efremova M.V., Veselov M.M., Barulin A.V., et al. In Situ Observation of Chymotrypsin Catalytic Activity Change Actuated by Nonheating Low-Frequency Magnetic Field // *ACS Nano*. 2018. Vol. 12, № 4. P. 3190–3199.
 226. Ефремова М.В., Мажуга А.Г., Головин Ю.И., et al. Наномеханика: адресная доставка лекарств // *Природа*. 2016. № 7. С. 3–11.
 227. Nel A., Xia T., Madler L., et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel // *Science* (80-.). 2006. Vol. 311, № 5761. P. 622–627.
 228. Li N., Xia T., Nel A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 44, № 9. P. 1689–1699.
 229. Patil U., Adireddy S., Jaiswal A., et al. *In Vitro/In Vivo* Toxicity Evaluation and Quantification of Iron Oxide Nanoparticles // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16, № 10. P. 24417–24450.
 230. Park J.H., Oh N. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells // *Int. J. Nanomedicine*. 2014. Vol. 9. P. 51–63.
 231. Nguyen D.H., Bae J.W., Choi J.H., et al. Bioreducible cross-linked Pluronic micelles: PH-triggered release of doxorubicin and folate-mediated cellular uptake // *J. Bioact. Compat. Polym.* 2013. Vol. 28, № 4. P. 341–354.
 232. Nizamov T.R., Garanina A.S., Grebennikov I.S., et al. Effect of Iron Oxide Nanoparticle Shape on Doxorubicin Drug Delivery Toward LNCaP and PC-3 Cell Lines // *Bionanoscience*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 394–406.
 233. Speelmans G., Staffhorst R.W.H.M., Steenbergen H.G., et al. Transport of the anti-cancer drug doxorubicin across cytoplasmic membranes and membranes composed of phospholipids derived from *Escherichia coli* occurs via a similar mechanism // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1996. Vol. 1284, № 2. P. 240–246.
 234. Kou L., Sun J., Zhai Y., et al. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines:

- Implication for rational design // Asian J. Pharm. Sci. 2013. Vol. 8, № 1. P. 1–10.
235. Walkey C.D., Chan W.C.W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41, № 7. P. 2780–2799.
236. Walkey C.D., Olsen J.B., Guo H., et al. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake // J. Am. Chem. Soc. 2012. Vol. 134, № 4. P. 2139–2147.
237. Zhang R.X., Ahmed T., Li L.Y., et al. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks // Nanoscale. 2017. Vol. 9, № 4. P. 1334–1355.
238. Nakamura Y., Mochida A., Choyke P.L., et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? // Bioconjug. Chem. 2016. Vol. 27, № 10. P. 2225–2238.
239. Miller M.A., Zheng Y.-R., Gadde S., et al. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug // Nat. Commun. 2015. Vol. 6, № 1. P. 8692.
240. Bouchaala R., Anton N., Anton H., et al. Light-triggered release from dye-loaded fluorescent lipid nanocarriers *in vitro* and *in vivo* // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2017. Vol. 156. P. 414–421.
241. Darwich Z., Klymchenko A.S., Dujardin D., et al. Imaging lipid order changes in endosome membranes of live cells by using a Nile Red-based membrane probe // RSC Adv. 2014. Vol. 4, № 17. P. 8481–8488.
242. Machulkin A.E., Garanina A.S., Zhironkina O.A., et al. Nanohybride materials based on magnetite-gold nanoparticles for diagnostics of prostate cancer: Synthesis and *in vitro* testing // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. Vol. 161, № 5. P. 706–710.
243. Machulkin A.E., Ivanenkov Y.A., Aladinskaya A. V., et al. Small-molecule PSMA ligands. Current state, SAR and perspectives // J. Drug Target. 2016. Vol. 24, № 8. P. 679–693.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы выражает глубокую благодарность своим научным руководителям д.х.н., проф. Клячко Наталье Львовне и д.х.н., проф. Мажуге Александру Георгиевичу за совместный многолетний труд, поддержку и наставничество, которые начались еще задолго до поступления в аспирантуру.

Автор благодарит внутреннего рецензента д.х.н., проф. Еремеева Николая Леонидовича, а также официальных оппонентов д.х.н., проф. Ямскова Игоря Александровича, д.б.н. Гроздову Ирину Дмитриевну и д.х.н., проф. Ярополова Александра Ивановича за внимательное прочтение работы и ценные комментарии.

Автор благодарит к.х.н., доц. Абакумова Максима Артемовича, коллектив кафедры физического материаловедения НИТУ «МИСиС» под руководством к.ф.-м.н., проф. Савченко Александра Григорьевича, д.ф.-м.н., проф. Головина Юрия Ивановича и д.х.н., проф. Кабанова Александра Викторовича за всестороннюю помощь и продуктивное обсуждение экспериментальных данных, которые улучшили не только саму работу, но и ее публичное представление.

Автор выражает особую благодарность приват-доценту, д-ру Ульф Видвальду, проф. д-ру Михаэлю Фарле и д-ру Марине Спасовой (Университет Дуйсбург-Эссен, Германия) за помощь и колоссальную поддержку на протяжении трех лет, которые вывели научную работу на принципиально новый уровень, а также серьезно отразились на качестве и количестве публикаций.

Автор благодарен к.х.н., м.н.с. Гараниной Анастасии Сергеевне и к.м.н., эксперту Наumenко Виктору Алексеевичу за незаменимую помощь в проведении и интерпретации биологических экспериментов, которые существенно обогатили работу с биомедицинской точки зрения.

Автор благодарит студентов и выпускников МГУ им. М.В. Ломоносова и НИТУ «МИСиС» Барулина Александра Владимировича, Блохину Анастасию Дмитриевну, Наленч Юлию Александровну, Гифер Полину Кирилловну за помощь в проведении экспериментов и чувство ответственности, которое удалось развить за последние годы.

Автор выражает благодарность факультету наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова и заведующей отделом аспирантуры Шаталовой Татьяне Борисовне за постоянную научную, образовательную и административную поддержку.

Автор благодарен коллективу лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ «МИСиС», а также кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за дружественную и продуктивную атмосферу.

Автор выражает искреннюю благодарность родным и близким за моральную поддержку, без которой бы не состоялось написания работы.