

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»

На правах рукописи

Никитин Алексей Андреевич

**Анизотропные наночастицы магнетита: синтез, изучение
физических и биологических свойств, а также оценка перспективы
использования в МРТ-диагностике**

05.16.08 Нанотехнологии и наноматериалы (Химия и химическая технология)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

А.Г. Мажуга

Научный консультант:

кандидат химических наук, доцент

М.А. Абакумов

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1 Методы получения анизотропных МНЧ сложных оксидов железа и оценка их магнитных свойств.....	9
1.1.1 Кубические МНЧ.....	11
1.1.2 Кластерные МНЧ	17
1.1.3 Стержневидные МНЧ	27
1.2 Таргетинг МНЧ.....	32
1.2.1 Липосомы и мицеллярные наноструктуры.....	32
1.2.2 Конъюгаты МНЧ с производными ПЭГ	33
1.3 Требования, предъявляемые к КА на основе МНЧ оксидов железа	37
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	41
2.1 Материалы и методы.....	41
2.2 Синтез образцов КНЧМ-10, КНЧМ-15, КНЧМ-20 и КНЧМ-30 из олеатного комплекса железа (III).....	44
2.3 Синтез образца КНЧМ-30 из ацетилацетоната железа (III).....	44
2.4 Синтез образцов КлНЧМ.....	45
2.5 Синтез образца СНЧМ N-1.....	45
2.6 Синтез образца СНЧМ D-1.....	46
2.7 Функционализация НЧ блок-сополимерами Pluronic (НЧ@Pluronic)	46
2.8 Функционализация НЧ лигандом на основеДФУК и производного аминокарбокси-ПЭГ (НЧ-ПЭГ-СООН).....	46
2.9 Функционализация НЧ флуоресцентным красителем цианин-5-амин (НЧ-ПЭГ-CONH-Cy5).....	47
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	48
3.1 Синтез и исследование физических свойств НЧ.....	48
3.1.1 Разработка методики синтеза кубических наночастиц магнетита (КНЧМ).....	48
3.1.2 Исследование структуры и магнитных свойств КНЧМ.....	53
3.1.3 Разработка методики синтеза кластерных наночастиц магнетита (КлНЧМ).....	54
3.1.4 Исследование структуры и магнитных свойств КлНЧМ.....	59
3.1.5 Разработка методики синтеза стержневидных наночастиц магнетита (СНЧМ).....	64
3.1.6 Исследование структуры и магнитных свойств СНЧМ.....	67
3.2 Функционализации НЧ сополимерами Pluronic.....	69
3.3 Сравнительный анализ магнитных свойств полученных НЧ	71

3.4 In vitro и in vivo исследования	77
3.4.1 Исследование токсичности НЧ in vitro	77
3.4.2 Исследование биораспределения НЧ in vivo, а также оценка перспективы их использования в качестве КА в МРТ-диагностике	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Магнитные наночастицы (МНЧ) все чаще применяются в различных направлениях биомедицины, например, выступая в качестве платформы для адресной доставки лекарств, в гипертермии для преобразования энергий внешних электромагнитных полей в тепловую энергию или в МРТ-диагностике. Несмотря на то, что ранее неоднократно было показано, что форма и размер нанокристаллов МНЧ обладают существенным влиянием на их магнитные и релаксационные свойства, до сих пор отсутствуют фундаментальные экспериментальные работы, которые устанавливали бы взаимоотношения между типом МНЧ, их физическими характеристиками, *in vitro* токсичностью, биораспределением в организме и контрастирующими свойствами в МРТ-диагностике на примере различных экспериментальных опухолевых моделей. МРТ, в отличие от других диагностических методов, позволяет достичь высокого пространственного разрешения и не имеет ограничений по проникновению вглубь тканей, а комбинация МРТ с T1- и T2-контрастными агентами (КА) позволяет контролируемо влиять на релаксацию протонов в окружающих тканях и получать МРТ-изображения с точной локализацией и границами опухолевого очага. КА на основе МНЧ сложных оксидов железа выступают безопасной альтернативой T1-КА, которые представлены хелатными комплексами Gd^{3+} и Mn^{2+} (Dotarem[®], Omniscan[®] и Gadavist[®]). В настоящий момент в клинике используется всего лишь один пероральный T2-КА Feraheme[®] (полидисперсные 3 нм НЧ $\gamma-Fe_2O_3$), применяемый при диагностике рака желудка и колоректального рака. Использование МНЧ Fe_3O_4 различной морфологии в качестве КА обусловлено, в первую очередь, биосовместимостью, низкой токсичностью, а также выраженными магнитными свойствами такого материала. Большинство экспериментальных работ, описывающих перспективы использования МНЧ Fe_3O_4 в КА, проведено на примере сферических МНЧ, тогда как наиболее привлекательными КА являются МНЧ с ярко выраженной анизотропией формы, изменяя которую можно управлять магнитными свойствами материала. Разработка новых методик синтеза анизотропных МНЧ с контролируемой формой и размером, в том числе последующая оценка перспективы использования таких МНЧ в качестве МРТ-контрастных агентов, позволит получить фундаментальные знания о взаимоотношении тип МНЧ – физические свойства МНЧ – биологический отклик, что обуславливает актуальность данной работы.

Степень разработанности темы. В отечественной и зарубежной научной литературе имеется большой объем данных по синтезу и исследованию МНЧ различной формы и размеров, в том числе данные о применении таких МНЧ в качестве КА при проведении МРТ-диагностики. Однако, до сих пор нет четкого понимания того, как тот или иной компонент

реакции влияет на форму и размер получаемых МНЧ. Кроме того, необходимо комплексное изучение того, как статические и динамические магнитные свойства МНЧ, которые являются определяющими с точки зрения применения МНЧ в МРТ, зависят от размера и морфологии последних, а также изучение влияния формы и размера МНЧ на их биораспределение в организме при внутривенном введении.

Цели и задачи работы. Цель данной работы заключалась в разработке методик синтеза и исследовании анизотропных МНЧ сложных оксидов железа с контролируемыми формой и размером для получения фундаментальных знаний о взаимоотношении тип МНЧ – физические свойства МНЧ – *in vitro* и *in vivo* свойства МНЧ, в том числе оценка перспективы их использования в качестве МРТ-КА.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие **задачи**:

1. Разработать методики синтеза анизотропных МНЧ сложных оксидов железа с контролируемыми формой и размером;
2. Исследовать структуру и морфологию МНЧ методами ПЭМ, РСА, ИК-спектроскопии, в том числе, исследовать их статические и динамические магнитные свойства;
3. Разработать способ получения стабильных водных коллоидов МНЧ в физиологических условиях;
4. Исследовать цитотоксичность МНЧ различных форм и размеров *in vitro*, изучить их биораспределение на животных с экспериментальными опухолевыми моделями, а также оценить перспективы использования таких МНЧ в качестве МРТ-КА.

Научная новизна. Впервые была разработана методика синтеза кластерных наночастиц магнетита (КлНЧМ) с использованием алифатических и ароматических циклических карбоновых кислот, а также исследовано влияние последних на форму и размер получаемых НЧ. Было показано, что как размер КлНЧМ, так и размер отдельных кристаллитов, из которых они состоят, уменьшается по логарифмическому закону с увеличением константы липофильности в ряду циклических алифатических карбоновых кислот. Измерения магнитных свойств КлНЧМ продемонстрировали высокие значения удельной намагниченности насыщения кристаллов, присущие объемному материалу, что объясняется проявлением магнитоэлектронного эффекта в полученных кластерных структурах.

Кроме того, была разработана оригинальная двухстадийная методика синтеза стержневидных наночастиц магнетита (СНЧМ) с использованием микроволнового излучения, позволяющая проводить контролируемое восстановление немагнитного прекурсора – стержневидных НЧ акагенита, до магнитных НЧ без потери их формы.

В случае кубических наночастиц магнетита (КНЧМ) было показано, что размер их магнитного ядра можно контролировать путем подбора мольного соотношения железосодержащего прекурсора к поверхностно-активным веществам (ПАВ), таким как олеиновая кислота и олеат натрия. При этом было показано, что размер ядра КНЧМ уменьшается по экспоненциальному закону с увеличением общего количества таких ПАВ в реакционной смеси. Также было систематически изучено влияние размера КНЧМ на их статические и динамические магнитные свойства в диапазоне размеров 10 – 30 нм. Было показано, что КНЧМ позволяют получать наибольшие значения скорости r_2 -релаксации протонов воды в сравнении с НЧ другой формы и несколько раз превышают аналогичные значения для коммерческих КА.

In vitro эксперименты на клеточных культурах 4Т1 (рак молочной железы), В16 (меланома), СТ26 (рак толстой кишки) показали нетоксичность функционализированных сополимером Pluronic F-127 НЧ в широком диапазоне концентраций вплоть до 200 мкг Fe·мл⁻¹, а *in vivo* МРТ-эксперименты на трех экспериментальных опухолевых моделях выявили высокую избирательность в их отношении именно КНЧМ и КлНЧМ. Выраженное накопление КНЧМ и КлНЧМ наблюдалось во всех трех типах опухолей, а в случае опухолевой модели В16 удалось достигнуть накопления КНЧМ почти в 10 раз превышающее среднее значение для пассивной доставки, известное из литературы.

Кроме того, впервые была проведена комплексная оценка влияния морфологии НЧ на их биорапределение в организме. Так, при изучении биораспределения КНЧМ и КлНЧМ кубической формы с одинаковыми размерами магнитного ядра (30 нм) и гидродинамическим размером (130 нм) было обнаружено непредсказуемое накопление КлНЧМ в почках экспериментальных мышей, ранее неописанное в научной литературе для НЧ такого типа. В результате, впервые с использованием комбинации методов интравитальной и просвечивающей электронной микроскопии был установлен подробный механизм накопления и выведения НЧ почками.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанные в данной диссертации экспериментальные методики получения биосовместимых анизотропных НЧ могут представлять собой практические рекомендации к созданию высокоэффективных КА для повышения эффективности визуализации внутренних тканей и органов при проведении МРТ-диагностики. Обнаруженный в работе эффект выраженного накопления КлНЧМ в почках при их внутривенном введении диктует необходимость более тщательного изучения механизмов фармакодинамики КА на основе МНЧ сложных оксидов железа в зависимости от формы их магнитного ядра, размера и химии поверхности. Кроме того, данные о биораспределении синтезированных анизотропных НЧ могут послужить основой для создания

новых типов КА, избирательных в отношении определённых мишеней. На основании проведенных исследований были разработаны и запатентованы способы получения КА на основе КЛНЧМ и СНЧМ (Патенты РФ № RU2664062C2, 2018; № RU2686931C1, 2019).

Методология и методы исследований. Методологическая основа диссертации представлена анализом современной научной литературы по изучаемой проблеме и общепринятыми методами проведения лабораторных исследований (экспериментов). В работе использованы следующие основные методы исследования: ПЭМ, РФА/РСА, мёссбауэровская спектроскопия, ИК-спектроскопия, магнитометрия, АЭС, ДСР, МРТ, интравитальная микроскопия.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанные методики синтеза анизотропных НЧ позволяют получать монодисперсные кубические, кластерные и стержневидные НЧ в диапазоне размеров 10 – 40 нм. Форма НЧ может контролироваться путем подбора специфического ПАВ, а размер и монодисперсность магнитного ядра – концентрацией ПАВ, продолжительностью синтеза и скоростью нагрева реакционной смеси.

2. Статические и динамические магнитные свойства НЧ, которые являются определяющими с точки зрения применения НЧ в качестве КА в МРТ, зависят от размера и формы последних и достигают оптимума для КНЧМ с размерами магнитного ядра 15 – 20 нм;

3. Форма НЧ является ключевым параметром, определяющим их биораспределение в организме при внутривенном введении препарата;

4. Объединение отдельных НЧ в кластерные структуры приводит к появлению новых свойств у материала за счет явления магнитостатического эффекта.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности представленных количественных данных определяется инструментальной погрешностью использованного аналитического оборудования и статистической обработкой полученных результатов.

Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях, в числе которых: Nanotechnology in Medicine: From Molecules to Humans (Хернштайн, Австрия, 2016); VII International Conference «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications» (Томск, Россия, 2016); XII Международная (XXI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, Россия, 2017); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017» (Москва, Россия, 2017); II Международная научно-практическая школа-конференция «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение» (Звенигород, Россия, 2017); International Baltic Conference on Magnetism «IBCM 2017» (Светлогорск, Россия,

2017); International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology «ICONAN 2017» (Барселона, Испания, 2017); XII International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers «MagMeet 2018» (Копенгаген, Дания, 2018); XI International Conference on Nanomaterials - Research & Application «NANOCON 2019» (Брно, Чешская Республика, 2019), VII Троицкая конференция с международным участием "Медицинская физика" (ТКМФ-7) (Москва, Россия, 2020).

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором или при непосредственном участии автора на всех этап проводимых исследований. Вся синтетическая часть работы, ключевые физико-химические исследования, а также обработка данных по биораспределению НЧМ в экспериментах на экспериментальных опухолевых моделях была проведена лично автором. Автор самостоятельно сформулировал цель и задачи работы, проанализировал весь массив полученных данных, на основании которых сделал соответствующие заключения и сформулировал выводы по проделанной работе.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 печатная работа, в числе которых 2 статьи в изданиях из перечня ВАК, 1 статья, входящая в базу данных научного цитирования РИНЦ, 7 статей, входящих в базы данных научного цитирования Scopus/Web of Science, 9 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций, 2 патента на изобретение.

Связь работы с государственными программами. Результаты работы были получены в рамках грантов ФЦП №14.607.21.0132; РФФИ № 18-29-0906; Министерства образования и науки РФ № К2-2018-008.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части, описывающей материалы, методики синтеза НЧ и методы их исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 108 страницах печатного текста, содержит 11 таблиц и 63 рисунка. Список литературы включает 145 источников.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Методы получения анизотропных МНЧ сложных оксидов железа и оценка их магнитных свойств

Несмотря на большое количество экспериментальных и теоретических работ, посвященных синтезу, функционализации, изучению физико-химических характеристик и биомедицинскому применению МНЧ, непрекращающиеся исследования в этой области несомненно подтверждают ее актуальность и значимость [9; 32; 58; 71; 93; 133; 137]. МНЧ различных форм, размеров и фазового состава активно применяются в биомедицине в качестве КА для повышения эффективности МРТ-диагностики злокачественных новообразований [67; 71], в качестве терапевтической компоненты в магнитожидкостной гипертермии [55; 139], в роли наноконтейнеров для адресной доставки лекарств [73; 98], в иммуноферментном анализе [2; 128], а также в магнитомеханике для дистанционного управления различными молекулами и молекулярными процессами [19; 33; 34; 102]. Повышенный интерес исследователей к МНЧ различного типа основан на их уникальных физических свойствах. В наноразмерном состоянии МНЧ имеют большую удельную площадь поверхности, которая может быть функционализирована различными биологически активными молекулами. Переход в наноразмерное состояние также обуславливает появление у МНЧ необычных магнитных свойств, таких как высокая намагниченность насыщения, магнитостатический эффект, высокая коэрцитивность и т.д. [129]. В данном обзоре пойдет речь об анизотропных МНЧ сложных оксидов железа, в частности, о магнетите (Fe_3O_4), так как данный материал является биосовместимым, нетоксичным и биоразлагаемым, а также обладает ярко выраженными магнитными свойствами, необходимыми в МРТ-диагностики, что делает его одним из самых интересных объектов для всесторонних исследований.

На сегодняшний день хорошо изучены преимущественно сферические МНЧ оксидов железа, а также получены данные о влиянии размера таких МНЧ на их магнитные свойства [108; 122], в то время как исследования анизотропных МНЧ оксидов железа с различным аспектным соотношением (то есть с различными пространственными размерами), весьма ограничены. До сих пор отсутствуют фундаментальные экспериментальные работы, которые устанавливали бы взаимоотношения между типом МНЧ, их физическими характеристиками, *in vitro* токсичностью, биораспределением в организме и МРТ-контрастирующими свойствами на примере различных экспериментальных опухолевых моделей. В первую очередь это обусловлено относительной трудностью синтеза монодисперсных анизотропных МНЧ с контролируемой формой и размером, требующего подбора специальных условий (способ

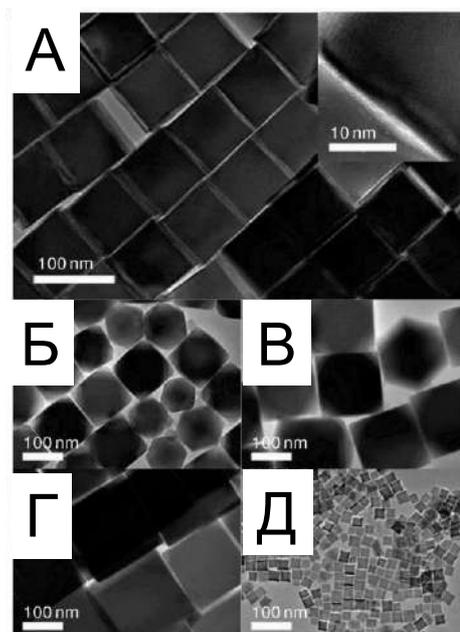
синтеза, прекурсоры, температура, продолжительность реакции и т.д.) и необходимостью применения специального оборудования. Изменяя форму МНЧ, можно изменять расположение атомов в каждой грани нанокристалла, что приводит, в итоге, к изменению его физических свойств. Так, например, было показано, что анизотропные МНЧ с высоким аспектным соотношением являются более эффективными КА в сравнении со сферическими МНЧ оксидов железа и позволяют получать более выраженный контраст на МР-изображениях при тех же концентрациях МНЧ [8]. Кроме того, неоднократно демонстрировалось, что анизотропные МНЧ оксидов железа позволяют в разы повысить эффективность магнитожидкостной гипертермии, демонстрируя высокие значения SAR [35; 68]. Выраженные магнитные свойства анизотропных МНЧ также могут быть эффективно использованы в магнитомеханике для преобразования энергий внешних негреющих переменных магнитных полей в механические колебания МНЧ и связанных с ними молекулами. В частности, для стержневидных МНЧ в жидких средах при приложении внешнего переменного низкочастотного магнитного поля наблюдается только броуновская релаксация их магнитного момента, обуславливающая вращение МНЧ в направлении вектора магнитного поля [138]. Данный эффект используется в магнитомеханике для дистанционного управления функциями различных молекул, активации ионных каналов клеточных мембран, а также в терапии различных заболеваний [19; 33; 34; 102]. Кроме того, высокая намагниченность насыщения анизотропных МНЧ сложных оксидов железа позволяет проводить магнитную сепарацию различных компонентов раствора даже в очень слабых магнитных полях [72]. Говоря об *in vivo* применениях МНЧ, таких как МРТ-диагностика и адресная доставка лекарств, в первую очередь, стоит отметить, что анизотропные МНЧ обладают наиболее благоприятной фармакокинетикой с более длительным временем циркуляции МНЧ по кровотоку. Кроме того, анизотропные МНЧ отличаются повышенным накоплением и удержанием в опухолевых тканях (EPR-эффект), а также, зачастую, нетипичным для МНЧ сферической формы биораспределением [12; 100]. При одинаковом геометрическом объеме сферической и анизотропной МНЧ последняя имеет более развитую площадь поверхности, которая может быть более эффективно функционализирована различными органическими лигандами, терапевтическими молекулами, флуоресцентными красителями, а также различными векторными молекулами.

Первые попытки синтезировать анизотропные МНЧ основывались на использовании платины [54], платины-палладия [123], кобальта [27], или никеля [28] в качестве зародышей для контроля формы будущих нанокристаллов. Однако из-за присутствия в реакционной смеси большого количества различных металлических компонент, а также различных реагентов, весьма сложно оценить реальный механизм образования МНЧ ввиду множества протекающих при этом процессов. Более того, присутствие тяжелых металлов в составе МНЧ делает их

весьма токсичными и, соответственно, существенно ограничивает дальнейшее применение таких МНЧ в биомедицинских целях. В настоящее время синтез анизотропных МНЧ сложных оксидов железа чаще всего проводят методом высокотемпературного (термического) разложения металлосодержащих прекурсоров [88] или гидротермальным методом с применением автоклавов [50]. Контроль за формой образующихся МНЧ осуществляется путем подбора специальных ПАВ, которые специфически адсорбируются на различных гранях образующихся зародышей, предотвращая, тем самым, рост кристалла в определенных направлениях и приводя к получению МНЧ желаемой формы.

1.1.1 Кубические МНЧ

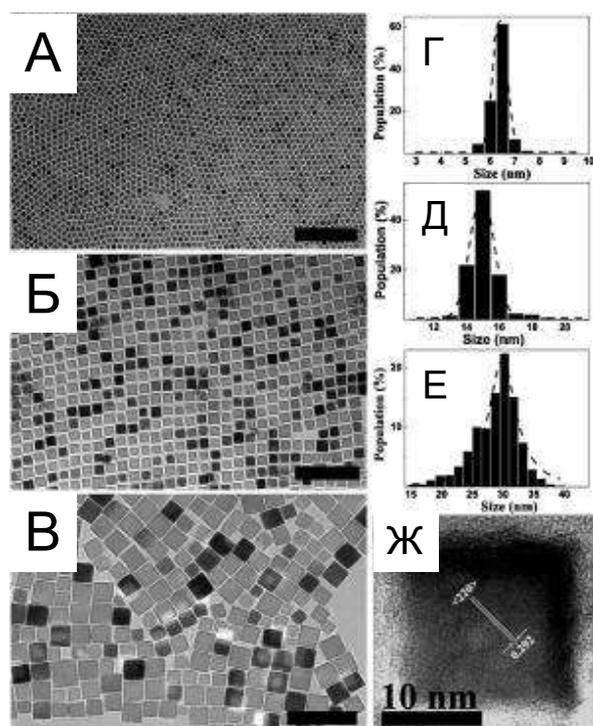
Ранее неоднократно демонстрировалось, что кубические МНЧ оксидов железа способны генерировать высокий T2-контраст в МРТ-экспериментах [8; 100], в связи с чем многие научные группы занимаются поиском и разработкой оптимальных методов синтеза именно кубических МНЧ с контролируемыми размерами. В научной литературе имеется ряд противоречий в объяснении механизма формирования МНЧ кубической формы методом термического разложения железосодержащих прекурсоров. Например, чтобы синтезировать монодисперсные кубические МНЧ Fe_3O_4 с размерами от 20 до 160 нм (Рисунок 1) авторы работы [124] применили метод термического разложения $\text{Fe}(\text{acac})_3$ в дибензиловом эфире с добавлением ОА в качестве ПАВ. При этом было показано, что размер нанокристаллов можно контролировать, изменяя условия эксперимента. Например, при уменьшении количества растворителя и увеличении продолжительности реакции с 30 мин до 1 ч, были получены МНЧ с размером ~ 110 нм, состоящие из усеченных кубов и октаэдров (Рисунок 1Б). Дальнейшее увеличение продолжительности реакции до 1,5 и 2 ч привело к формированию более крупных МНЧ с практически совершенной кубической формой и размерами 150 и 160 нм, соответственно (Рисунок 1Г). Методом ПЭМВР было установлено, что нанокубы были образованы в результате быстрого роста кристалла вдоль направлений [111], тогда как поверхность кристалла на ПЭМ-изображениях соответствовала плоскостям (100).



А – кубические МНЧ с размером 79 нм (вставка: изображение ПЭМВР), Б – смесь усеченных кубических и усеченных октаэдрических МНЧ со средним размером 110 нм, В – усеченные кубические МНЧ с размером 150 нм, Г – кубические МНЧ с размером 160 нм, Д – кубические МНЧ с размером 22 нм

Рисунок 1 – ПЭМ-изображения МНЧ Fe_3O_4 [124]

Примечательно, что магнитометрия не выявила никакой зависимости между значениями удельной намагниченности насыщения J_S МНЧ и их средним размером, тогда как в случае коэрцитивности отчетливо прослеживался рост ее значений с увеличением размера ядра МНЧ. Напротив, Yang с соавторами показали, что намагниченность насыщения кубических МНЧ Fe_3O_4 напрямую зависит от их среднего размера [116]. Кубические МНЧ Fe_3O_4 с размерами от 6,5 до 30 нм были синтезированы термическим разложением $\text{Fe}(\text{acac})_3$ в дибензиловом эфире с добавлением 1,2-HDD, OA и OAm (Рисунок 2). При этом, 15 нм кубические МНЧ были синтезированы при скорости нагрева реакционной смеси $15\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ и продолжительности кипячения 1 ч. Повышение скорости нагрева реакционной смеси до $35\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ и снижение продолжительности кипячения реакционной смеси до 20 мин привело к образованию небольших нанокубов с размером менее 10 нм, что объясняется относительно более высокой скоростью зародышеобразования, которая способствует первоначальному формированию большего количества ядер МНЧ.



А – 6,5 нм МНЧ, Б – 15,0 нм МНЧ, В – 30,0 нм МНЧ, Г-Е – гистограммы распределения МНЧ по размерам, Ж – ПЭМВР-изображение одиночных 15,0 нм нанокубов с межплоскостным расстоянием 0,292 нм для плоскости (220)

Рисунок 2 – ПЭМ-изображения и гистограммы распределения МНЧ Fe_3O_4 по размерам [116]

Для получения более крупных 30 нм кубических МНЧ реакционная смесь нагревалась со скоростью $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ (медленная скорость зародышеобразования) и выдерживалась в течение 3 часов при кипячении. Примечательно, что в отличии, например, от работы [124], авторы отмечают, что такой одностадийный синтез монодисперсных нанокубов с контролируемым размером можно осуществить только путем регулирования скорости нагрева и продолжительности кипячения реакционной смеси. Магнитные измерения показали, что значения удельной намагниченности насыщения J_s МНЧ составляют 39,5, 80,5 и 83,0 $\text{A}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ для кубических МНЧ Fe_3O_4 с размерами 6,5, 15,0 и 30,0 нм, соответственно.

Для лучшего понимания процесса формирования и роста кубических МНЧ Fe_3O_4 в реакциях термического разложения железосодержащих прекурсоров, авторы работы [105] детально исследовали влияние различных экспериментальных условий (количество растворителя, температура, продолжительность реакции, мольное соотношение ПАВ – олеиновой кислоты к олеиламину) на форму и размер получаемых МНЧ. При этом было показано, что форму и однородность получаемых МНЧ можно контролировать, изменяя количество и соотношение ПАВ. Аналогично работе [116], авторы продемонстрировали

ключевую роль температуры и общей продолжительности реакции в процессе формирования кубических МНЧ Fe_3O_4 . При температуре 220 °С и продолжительности реакции 2 ч образовывались только сферические МНЧ, тогда как кубических МНЧ в образце не наблюдалось. Однако повышение температуры реакции до 240 °С привело к образованию значительного количества именно кубических МНЧ. При температуре 260 °С было продемонстрировано влияние продолжительности реакции на форму получаемых МНЧ. Так, через 30 мин МНЧ имели неправильную нерегулярную форму, и лишь изредка в образце встречались МНЧ кубической формы. Увеличение продолжительности реакции до 1 ч привело к значительному увеличению числа кубических МНЧ в образце. Таким образом, экспериментальные результаты показывают, что для получения именно кубических МНЧ Fe_3O_4 желательны высокая температура и длительная продолжительность реакции.

В противоположность вышеописанным работам, в которых образование кубической формы МНЧ объяснялось влиянием ПАВ – жирных кислот и их производных, а также температурой и продолжительностью реакции, Zhichuan Xu с соавторами использовали в качестве прекурсора для синтеза МНЧ кубической формы хлорид железа (III) и объяснили механизм формирования МНЧ влиянием ионов Cl^- [91]. Авторы утверждают, что именно галогенид-ионы, включая Cl^- и Br^- , оказывают решающее влияние на стабилизацию граней (100) в процессе роста МНЧ, приводящую к формированию нанокубов, а не регулирование кинетики термолиза и/или соотношения ПАВ. Однако такое предположение никак не находит подтверждения в случае использования для синтеза МНЧ кубической формы прекурсоров, не содержащих галогенид-ионы. Кроме того, авторы говорят о том, что образование нанокристаллов оксида железа происходило только при температуре выше 310 °С, тогда как никаких МНЧ не образовывалось ниже данной температуры, что, однако, также не находит подтверждений в других научных источниках.

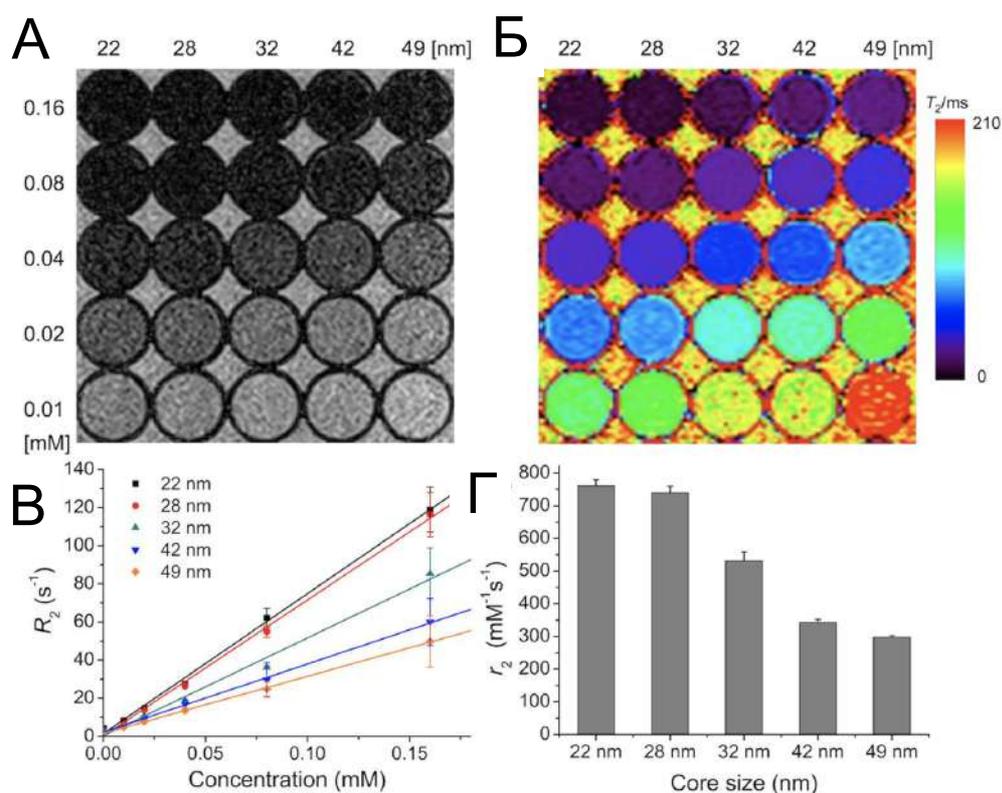
Однако тип термически разлагаемого металлосодержащего прекурсора все же может оказывать существенное влияние на форму получаемых МНЧ. Для демонстрации этого, Lyudmila M. Bronstein с соавторами провели ряд синтезов МНЧ оксидов железа путем термического разложения предварительно синтезированных комплексов олеата железа (III) (FeOL), имеющих различное строение [52]. FeOL содержит в своем составе значительную долю олеиновой кислоты, которая действует как модификатор, изменяющий процесс разложения прекурсора, и как дополнительный стабилизатор во время образования МНЧ. Авторы показали, что термическая обработка FeOL при 70 °С приводила к удалению кристаллогидратной воды и диссоциации димеров олеиновой кислоты, что, в свою очередь, приводило к более термически стабильному комплексу FeOL , окончательное разложение которого происходило при температуре около 380 °С. Экстракция FeOL этанолом и ацетоном приводила к удалению

олеиновой кислоты и полной реорганизации его структуры, что, в конечном итоге, повышало температуру зародышеобразования МНЧ и уменьшало температурный интервал ΔT между процессом зародышеобразования и процессом роста МНЧ. Когда $\Delta T = 5$ °С образовывались полидисперсные МНЧ, тогда как большие значения ΔT позволили получить монодисперсные МНЧ с размерами в диапазоне 8,5 – 23,4 нм, в том числе, отличающиеся по форме. Таким образом, на основании представленных работ можно сделать вывод, что на процесс формирования МНЧ оксидов железа кубической формы влияют очень многие реакционные параметры, в связи с чем, говорить об исключительной роли какого-либо одного параметра было бы неверно.

Как уже отмечалось выше, кубические МНЧ магнетита позволяют получать одни из самых высоких значений скорости r_2 -релаксации протонов воды в сравнении с МНЧ других форм. Так, в работе [45] методом термического разложения FeOL с добавлением ОА в 1-октадецене (320 °С) авторы синтезировали монодисперсные кубические МНЧ Fe₃O₄ с размером $9,7 \pm 0,5$ нм и продемонстрировали их высокий потенциал в МРТ-диагностике в качестве двойных T1-T2 КА. Как отмечают сами авторы, синтезированные МНЧ продемонстрировали очень низкое значение удельной намагниченности насыщения $J_s = 18$ А·м²·кг⁻¹, что гораздо ниже, чем аналогичное значение для МНЧ Fe₃O₄ такого же размера, известное из литературы ($J_s = 65$ А·м²·кг⁻¹). В результате, из-за того, что невысокий магнитный момент вызывает слабую магнитную неоднородность вокруг МНЧ, значения параметров r_1 и r_2 оказались невысокими и составили 5,23 и 89,68 с⁻¹·мм⁻¹, соответственно. После функционализации МНЧ тетраэтоксисиланом также была проведена оценка их цитотоксичности *in vitro* в диапазоне концентраций 0,25 – 200 мкг Fe·мл⁻¹ на фибробластоподобной опухолевой клеточной линии L929. Заметной токсичности МНЧ не было выявлено даже при очень высоких концентрациях (100 мкг Fe·мл⁻¹). Авторы также провели *in vivo* МРТ-визуализацию почек крыс. Суспензии МНЧ вводились внутривенно (1 мг МНЧ·кг⁻¹ веса), после чего в режимах T1 и T2 проводили регистрацию МР-изображений почек через 30 и 60 мин, соответственно. Несмотря на то, что в почках, как правило, накапливаются МНЧ, имеющие размер <5 нм, авторы наблюдали выраженное накопление исследуемых наноконъюгатов, которое они объясняют возможным влиянием функциональной оболочки из диоксида кремния. Действительно, существует несколько работ, посвященных почечному клиренсу МНЧ, покрытых диоксидом кремния, в том числе МНЧ с размерами, превышающими несколько десятков нанометров [75; 132].

Еще одним примером, демонстрирующим высокий потенциал кубических МНЧ в МРТ-диагностике, является работа [142]. Кубические МНЧ оксида железа с размерами 22 – 49 нм были синтезированы термическим разложением Fe(acac)₃ с добавлением ОА и

4-дифенилкарбоновой кислоты в дибензиловом эфире при 290 °С [142]. После инкапсулирования в ПЭГ-фосфолипид, авторы продемонстрировали биосовместимость полученных МНЧ и отсутствие какой-либо цитотоксичности вплоть до концентрации 0,75 мг Fe·мл⁻¹. С помощью МРТ-экспериментов, в том числе *in vivo* экспериментов на модели глиомы, были продемонстрированы крайне высокие значения параметра r_2 для протонов воды в присутствии 22 нм кубических МНЧ (761 с⁻¹·мМ⁻¹), а также снижение значений данного параметра с увеличением среднего размера МНЧ, начиная с 30 нм (Рисунок 3).



А – T2-взвешенные МР-изображения коллоидных растворов МНЧ оксида железа при различных концентрациях железа при 3 Тл, Б – цветные изображения T2-взвешенных МР-изображений, В – графики зависимости значений R_2 -релаксивности протонов воды в присутствии МНЧ оксида железа различных размеров, Д – сравнение значений параметра r_2 -релаксации для МНЧ различного размера

Рисунок 3 – МР-контраст коллоидных растворов кубических МНЧ оксида железа в зависимости от размера ядра МНЧ [142]

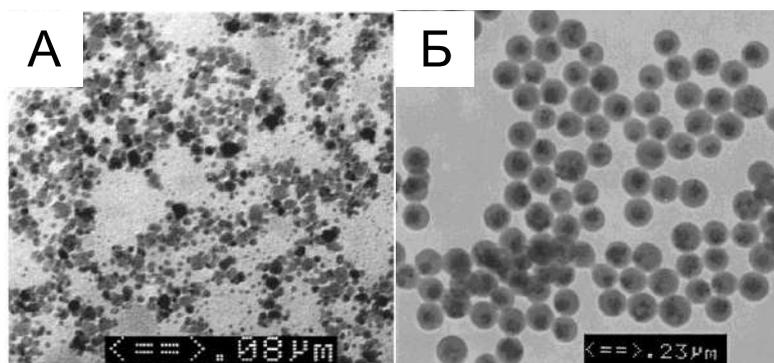
Такую закономерность авторы объясняют тем, что МНЧ с размером магнитного ядра более 30 нм агрегируют из-за их сильных магнитных диполь-дипольных взаимодействий, тогда как общий размер всего агрегата становится >200 нм. Поскольку такие большие агрегаты МНЧ

создают очень сильные локальные неоднородности магнитного поля, находящиеся вблизи протоны молекул воды полностью дефазированы и не могут вносить вклад в T2 МР-сигнал. Следовательно, для крупных агрегатов МНЧ значение параметра r_2 уменьшается с увеличением размера МНЧ, что также известно как режим «Luz-Meiboom» [16].

1.1.2 Кластерные МНЧ

Многие научные группы, занимающиеся синтезом и изучением свойств МНЧ, также уделяют повышенное внимание кластерным МНЧ в связи с тем, что контролируемая сборка или упорядочивание индивидуальных небольших МНЧ в кластерные структуры с определенной формой и размером позволяет получить материал, обладающий двойственной природой. С одной стороны, свойства кластерных МНЧ обусловлены вкладом каждой отдельной МНЧ в общую структуру, а другой – каждый кластер может рассматриваться как индивидуальный объект. Синтез кластерных структур может осуществляться двумя основными путями: двухэтапной процедурой, включающей синтез отдельных МНЧ и их дальнейшую агрегацию контролируемым образом [10; 64; 104], и одностадийным методом, в котором самосборка отдельных МНЧ в кластеры происходит параллельно образованию самих МНЧ [136; 144].

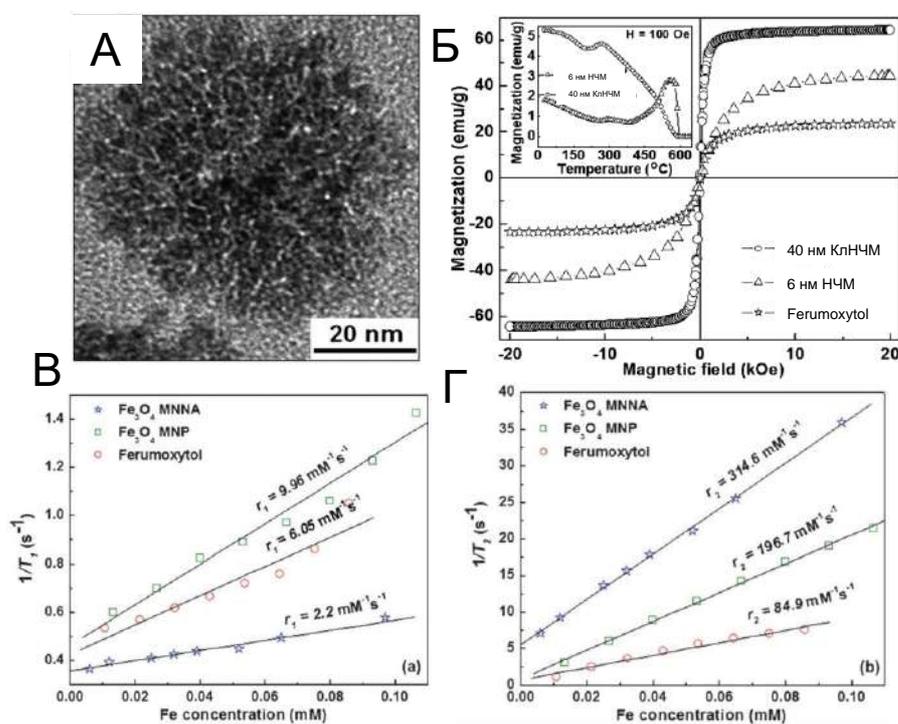
S.A. Asher с соавторами [117] впервые описали синтез 134 нм кластерных МНЧ эмульсионной полимеризацией с использованием полистирола. При этом МНЧ оксида железа (2 – 15 нм), из которых затем собирался кластер, были предварительно синтезированы соосаждением солей FeCl_2 и FeCl_3 в сильнощелочной среде (Рисунок 4).



А – исходные НЧ оксида железа, Б – кластерные НЧ

Рисунок 4 – ПЭМ-микрофотографии НЧ [117]

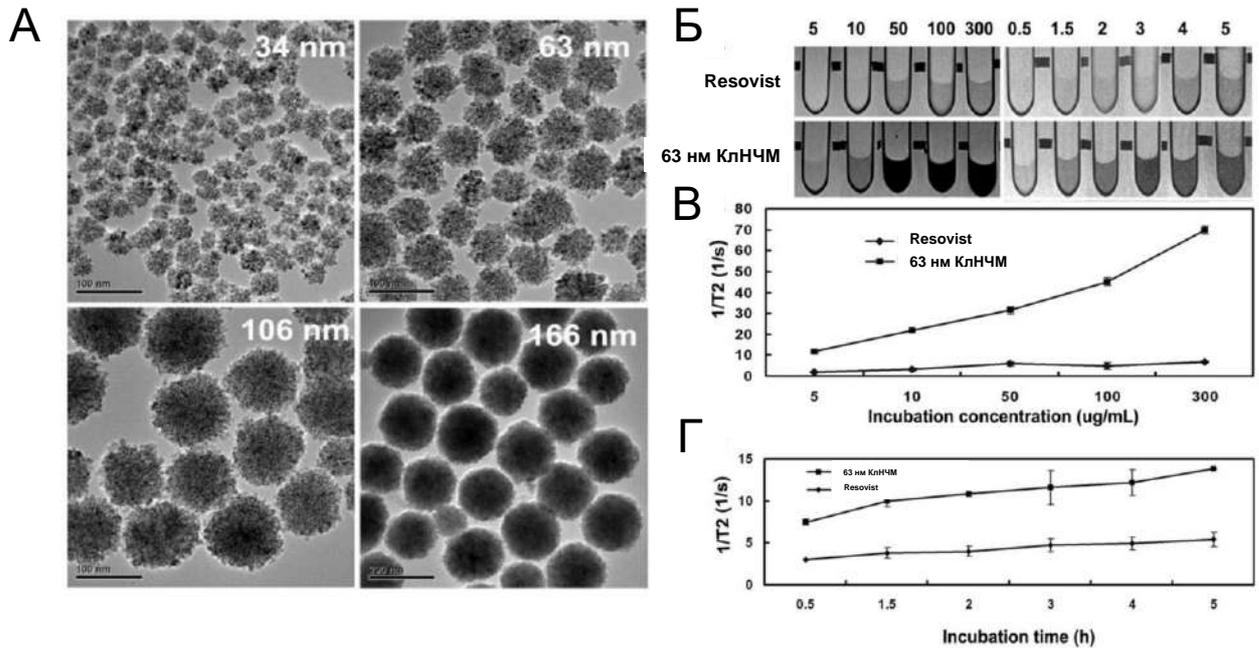
Широкое применение на практике нашел метод синтеза гидрофильных кластерных МНЧ в этиленгликоле в присутствии различных дополнительных веществ. Так, К. С. Varick с соавторами разработали новый класс КА для МРТ-диагностики на основе 40 нм КлНЧМ, составленных из отдельных нанокристаллов с размером 6 нм [85]. КлНЧМ синтезировали из смеси хлоридов железа ($n(\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}) = 1/2$) в присутствии ацетата натрия и этилендиамина в этиленгликоле при 197 °С (Рисунок 5). Точный механизм реакции до сих пор не установлен, однако авторы полагают, что в условиях эксперимента молекулы этилендиамина могут реагировать с молекулами ПЭГ, которые образуются в результате реакции полимеризации этиленгликоля во время синтеза КлНЧМ, с образованием конъюгатов, которые затем хемосорбируются на поверхность КлНЧМ через аминогруппы. Проведенные исследования показали, что самосборка отдельных нанокристаллов в кластерные структуры приводит к значительному увеличению как удельной намагниченности насыщения J_s , так и параметра $R2$ -релаксивности (Рисунок 5А-Б). Так, значения J_s и r_2 для 6 нм МНЧ составили $43,2 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$ и $196,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, соответственно, а после их самосборки в кластерные структуры – $64,3 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$ и $314,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, соответственно. Более выраженные магнитные свойства КлНЧМ, в сравнении с индивидуальными исходными МНЧ, авторы объясняли синергетическим магнетизмом множества МНЧ, собирающихся в кластер.



А – ПЭМ-микрофотография КлНЧМ, Б – кривые намагничивания образцов НЧ при $T = 300$ К,
В – зависимость параметра $R1$ -релаксивности от концентрации железа в составе КлНЧМ,
Г – зависимость параметра $R2$ -релаксивности от концентрации железа в составе КлНЧМ

Рисунок 5 – Структура и свойства КлНЧМ [85]

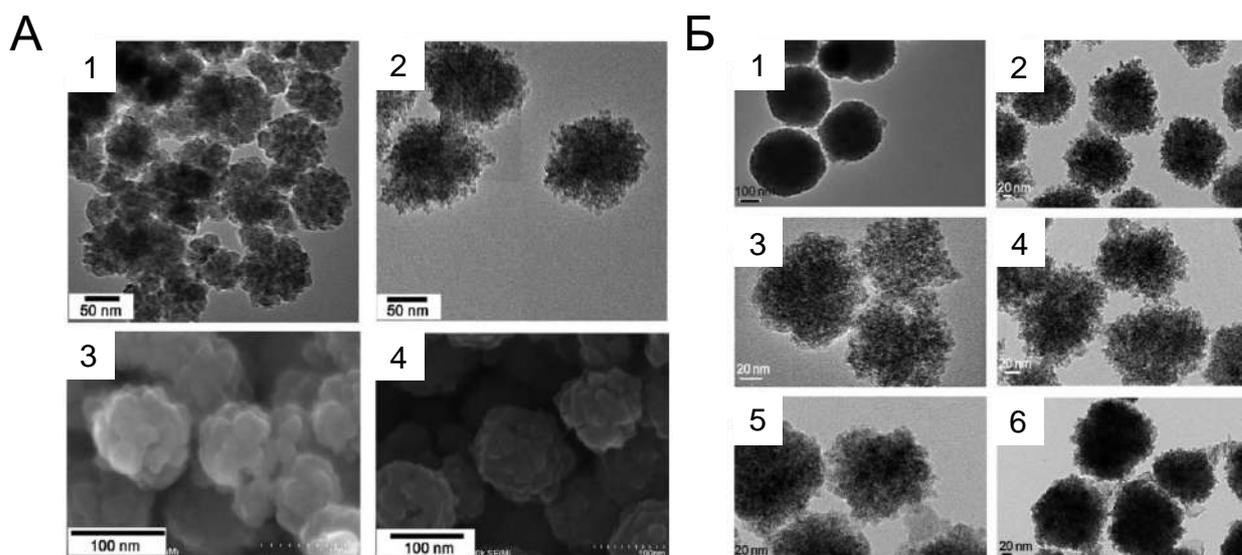
Mingli Li с соавторами [66] использовали гидротермальный подход для получения КлНЧМ с размерами 34, 63, 106 и 166 нм и размерами отдельных кристаллитов 11, 12, 9 и 14 нм, соответственно (Рисунок 6А). В качестве прекурсора был использован раствор FeCl_3 в этиленгликоле с добавлением полиакриловой кислоты ($M_w = 5000$ г·моль⁻¹) и мочевины, который затем помещался в автоклав и нагревался до 200 °С. Как и в предыдущем случае, авторы не описывают точный механизм формирования кластеров, однако, объясняют их образование присутствием в реакционной смеси полиакриловой кислоты, которая хемосорбируется на МНЧ в процессе образования кластера. Примечательно, что максимальное значение r_2 (630 мМ⁻¹·с⁻¹) было зарегистрировано для 63 нм КлНЧМ, тогда как для КлНЧМ с размерами >63 нм значения r_2 снижались и составили 420 и 270 мМ⁻¹·с⁻¹ для 106 и 166 нм КлНЧМ, соответственно (унимодальное распределение). В то же время, значения J_s всех образцов практически не отличались друг от друга и составили 68, 69, 67 и 74 А·м²·кг⁻¹ для 34, 63, 106 и 166 нм КлНЧМ, соответственно. Для 63 нм КлНЧМ были проведены *in vitro* исследования на культуре клеток макрофагов RAW 267.4, которые показали, что такие кластеры демонстрируют гораздо более высокую эффективность и чувствительность при МРТ-визуализации, чем коммерческий КА Resovist (Рисунок 6Б-Г).



А – ПЭМ-микрофотографии КЛНЧМ, Б – T2-взвешенные МР-изображения суспензии клеток с образцами НЧ в желатине, В – зависимость параметра R2-релаксивности от концентрации КЛНЧМ через 1 ч инкубации, Г – зависимость параметра R2-релаксивности от продолжительности инкубации КЛНЧМ с клетками при концентрации [КЛНЧМ] = 10 мкг·мл⁻¹

Рисунок 6 – Структура и свойства КЛНЧМ различного типа [66]

В другой работе F. Dong с соавторами [46] продемонстрировали, что ацетат аммония и цитрат натрия играют решающую роль в контроле пористости получаемых КЛНЧМ. Было обнаружено, что количество цитрата натрия является важным синтетическим фактором, увеличение которого приводит к снижению размера отдельных кристаллитов в составе КЛНЧМ (Рисунок 7А). Механизм формирования КЛНЧМ авторы объясняют тем, что в начальный момент реакции ионы Fe³⁺ восстанавливаются этиленгликолем и ацетатом аммония с образованием первичных МНЧ. Затем первичные МНЧ постепенно агрегируют, чтобы минимизировать поверхностную энергию, однако из-за большого количества карбоксильных групп на поверхности МНЧ (сорбированные молекулы цитрата натрия) они не формируют далее большие монокристаллы [79]. Таким образом, низкая концентрация цитрата натрия приводит к образованию более крупных нанокристаллов в составе КЛНЧМ.



А – ПЭМ- и СЭМ-микрофотографии КЛНЧМ, синтезированных с использованием различного количества цитрата натрия (1,3 г (1), 0,18 г (2), 2,4 г (3), 0,72 г (4)), Б – ПЭМ-микрофотографии КЛНЧМ, синтезированных с использованием различного количества ацетата натрия (0 (3,6 г ацетата натрия) (1), 0,77 (2), 1,54 (3), 2,31 (4), 3,85 (5), 7,70 г (6))

Рисунок 7 – Структура и свойства КЛНЧМ различного типа [46]

Другим важным синтетическим фактором, который определял пористость структуры КЛНЧМ, была концентрация ацетата аммония. Увеличение его количества привело к тому, что КЛНЧМ становились значительно более рыхлыми (Рисунок 7Б), что объясняется, главным образом, образованием газообразного аммиака в результате гидролиза ацетата аммония в системе. Наличие больших пор в структуре КЛНЧМ позволило обеспечить высокую загрузку ибупрофена с последующим его замедленным высвобождением, необходимым в стратегии адресной доставке лекарств.

Ф. Хи и соавторы [111] синтезировали 200 нм КЛНЧМ, функционализированные кремнеземом, лимонной кислотой, а также ПЭИ и продемонстрировали эффективность их использования в МРТ-экспериментах в качестве КА. Среди всех исследованных образцов КЛНЧМ, функционализированные лимонной кислотой, продемонстрировали самое высокое значение r_2 ($360 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), тогда как для КЛНЧМ, функционализированных кремнеземом и ПЭИ, данное значение составило $299 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ и $124 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, соответственно. Авторы подчеркивают, что объемная доля МНЧ в кластере (f_v), а не размер кластера, играет решающую роль в определении R2-релаксивности протонов. КЛНЧМ, образованные в присутствии ПЭИ, имели наименьшее значение $f_v = 59,47\%$, и, как следствие, значение параметра r_2 было наименьшим. С увеличением f_v (от 63,30% для КЛНЧМ с кремнеземом до 85,74% для КЛНЧМ с

лимонной кислотой) релаксивность также увеличивалась. Этим же коллективом авторов [74] был синтезирован набор КЛНЧМ в диапазоне размеров 13 – 179 нм по методике, аналогичной [66], и продемонстрировано максимальное значение параметра $r_2 = 650 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ для 64 нм КЛНЧМ (Рисунок 8). Авторы объясняют столь высокое значение релаксивности протонов воды в присутствии КЛНЧМ их высокой удельной намагниченностью насыщения ($68 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$), а также высокой агрегативной стабильностью в водных растворах.

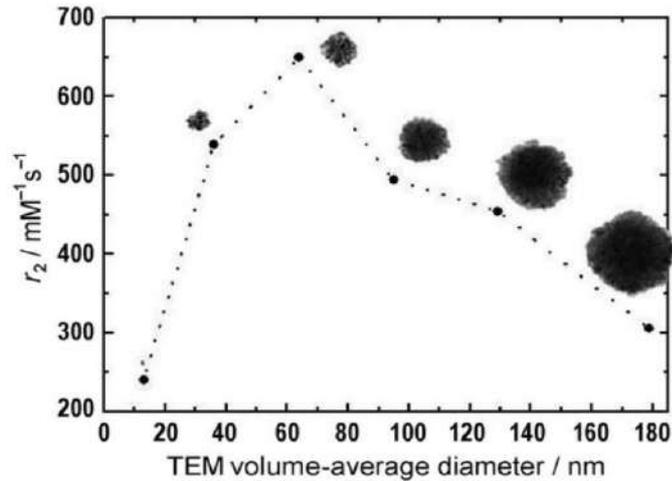
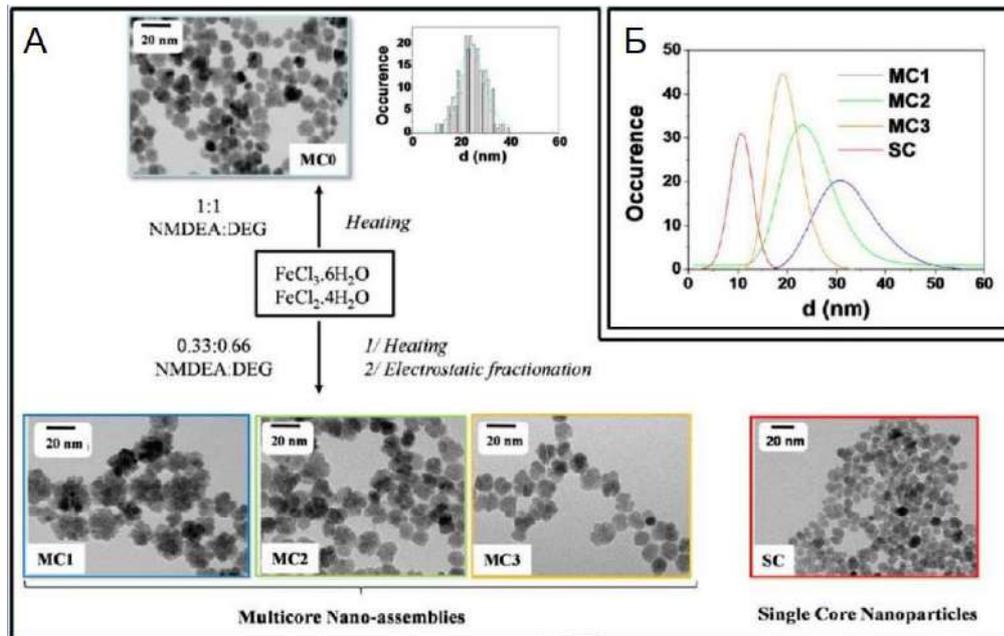


Рисунок 8 – Зависимость скорости r_2 -релаксации протонов воды от размера КЛНЧМ [74].

В другой работе L. Lartigue с соавторами [29] также при помощи полиольного метода синтезировали КЛНЧМ в диапазоне размеров 20 – 29 нм. В качестве ПАВ использовались ДЭГ и *N*-метилдиэтанолламин. Полученные значения r_2 находились в диапазоне 300 – 350 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, а значения $J_S = 65 - 82 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$ (Рисунок 9).

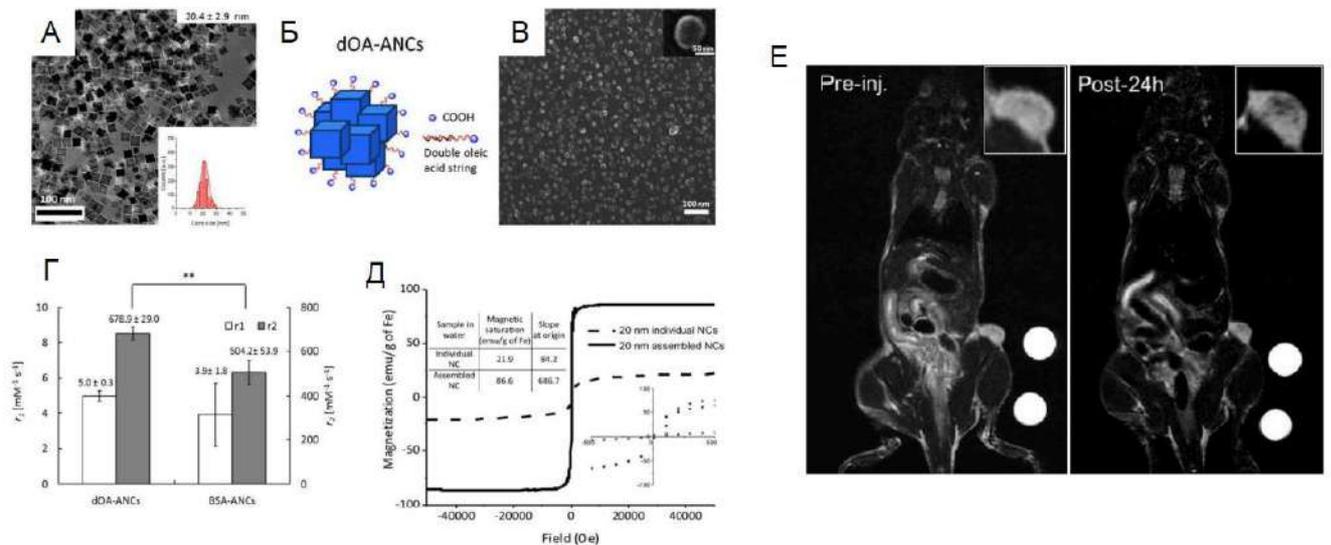


А – схема синтеза различных образцов МНЧ (MC0 образуются при использовании стехиометрической смеси двух полиолов, а остальные образцы получают путем электростатической сортировки по размеру полидисперсной суспензии, полученной с использованием смеси *N*-метилдиэтанолamina(NMDEA)/ДЭГ (DEG) в соотношении 0,33:0,66),
 Б – распределение МНЧ по размерам, рассчитанное путем измерения 300 МНЧ в каждом случае
 Рисунок 9 – МНЧ, полученные полиольным методом [29]

Другим экспериментальным подходом для получения КлНЧМ является термическое разложение железосодержащих прекурсоров в высококипящих растворителях. D. Maity с соавторами [86] описали метод синтеза 44 нм КлНЧМ путем термического разложения $\text{Fe}(\text{acac})_3$ в смеси ТЭГ/ТЭА в объемном соотношении 1:4. Образование КлНЧМ авторы объясняют агрегацией отдельных НЧМ с целью уменьшения их поверхностной энергии в условиях высокой концентрации зародышей и недостатка стабилизирующего агента ТЭГ. Было показано, что синтезированные КлНЧМ обладают более высоким значением $J_s = 75 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ в сравнении с аналогичными некластеризованными МНЧ ($J_s = 63 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$), а также проявляют более выраженные контрастирующие свойства ($r_2 = 295 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$; для некластеризованных МНЧ $r_2 = 206 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$). Более того, авторы продемонстрировали, что такие КлНЧМ могут быть эффективно использованы в гипертермии. Высокое значение SAR, производимое КлНЧМ и равное $500 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$ при напряженности переменного магнитного поля $89 \text{ кА} \cdot \text{м}^{-1}$ и частоте 240 кГц привело к потере жизнеспособности клеток MCF-7 в 74% случаев.

Еще одним наглядным примером, демонстрирующим превосходство магнитных свойств кластеризованных МНЧ над индивидуальными МНЧ, из которых они образованы, является

работа М. Cho и соавторов [10], в которой было продемонстрировано, что сборка заранее синтезированных кубических 20 нм МНЧ оксида железа (NCs) в 100 нм кластерные структуры при помощи создания двойного слоя молекул олеиновой кислоты (dOA-ANCs) или путем покрытия кубических МНЧ бычьим сывороточным альбумином (BSA-ANCs), позволяет получать экстремально высокие значения параметра r_2 , которые могут быть эффективно использованы в *in vivo* МРТ-визуализации глиобластомы U87-MG (Рисунок 10).

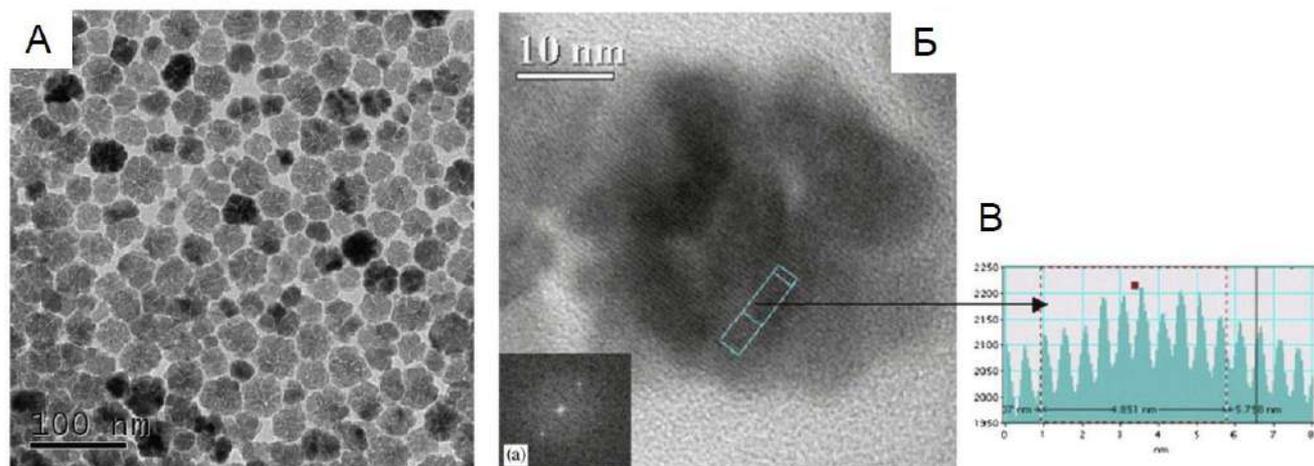


А – ПЭМ-микрофотография 20 нм кубических МНЧ оксида железа (NCs), Б – схематическое изображение кластеров, В – СЭМ-микрофотография кластеров, полученных путем создания бислоя молекул олеиновой кислоты (dOA-ANCs), Г – значения параметров r_1 и r_2 для водных суспензий кластерных МНЧ, Д – кривые намагничивания индивидуальных NCs и кластерных dOA-ANCs при $T = 300$ К, Е – МРТ-изображения экспериментальных мышей с глиобластомой до и через 24 ч после внутривенного введения BSA-ANCs в концентрации $5 \text{ mg Fe} \cdot \text{kg}^{-1}$ веса

Рисунок 10 – Структура и свойства кубических МНЧ оксида железа [10]

Говоря о методах синтеза кластерных МНЧ с использованием “нестандартных” ПАВ, необходимо отметить, что ранее было описано влияние объемной адамантановой группы в составе 1-адамантанкарбоновой кислоты и 1-аминоадамантана на образование коллоидных нанокластеров магнетита (Рисунок 11) [144]. Авторы полагают, что объемные группы 1-аминоадамантана могли снизить его реакционную способность с комплексом железа, а затем вызвать образование нерегулярных МНЧ с высокой поверхностной энергией. Небольшие МНЧ имеют тенденцию к росту через направленный путь агрегации для снижения поверхностной энергии. В то же время, МНЧ, с адсорбированными на их поверхности молекулами

1-адамантанкарбоновой кислотой, будут иметь более высокую поверхностную энергию, чем МНЧ, покрытые ПАВ линейного типа, такими как ОА или ОАм. Напряжения, связанные с дефектами, вызванными изначальным несовпадением на границе раздела МНЧ-МНЧ, могут быть достаточными, чтобы вызвать вращение кристаллитов, приводящее к упорядоченной конфигурации отдельных МНЧ в кластере.

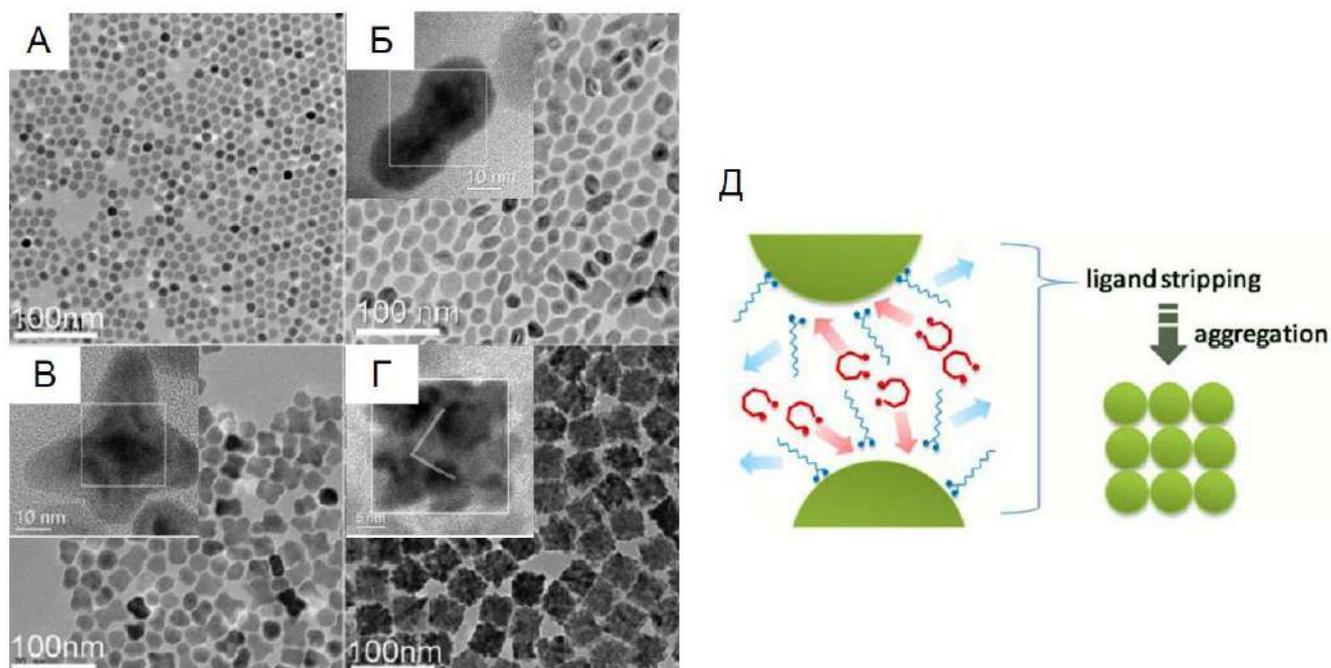


А – ПЭМ-микрофотография КлНЧМ, Б – ПЭМВР-микрофотография одиночного кластера (на вставке представлена электронограмма кластера с Фурье-преобразованием), В – анализ расстояний между решетками кристалла в кластере для выбранной области

Рисунок 11 – ПЭМ-микрофотографии и анализ структуры КлНЧМ [144]

Согласно концепции J. Fu и соавторов [40] ключевым этапом формирования нанокластера является процесс адсорбции-десорбции органических лигандов на поверхности изначальнo образующихся зародышей НЧ. Для доказательства этой концепции авторы синтезировали кубические кластерные МНЧ оксида железа термическим разложением $\text{Fe}(\text{CO})_5$ в смеси ДЭГ, 1-октадецена и ОА при 295 °С с последующим дополнительным окислением образовавшихся кластерных НЧ кислородом воздуха для превращения немагнитной фазы FeO в магнитную. Кроме того, были синтезированы димерные и олигомерные структуры, заменой ДЭГ на ПЭГ ($M_w = 400 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$) и ТЭЭГ, соответственно (Рисунок 12). На начальной стадии $\text{Fe}(\text{CO})_5$ реагирует с ОА с образованием FeOL, который затем разлагается с образованием зародышей НЧ, содержащих на своей поверхности молекулы ОА. Разложение комплекса FeOL способствует росту нанокристаллов. В то же время значительно снижается концентрация ОА в реакционном объеме, так как продукты разложения испаряются, что позволяет диолам “атаковать” поверхность нанокристаллов и замещать молекулы ОА (Рисунок 12Д). С другой стороны, степень адгезии диолов на поверхности растущих нанокристаллов значительно

уменьшается при высоких температурах, что приводит к их десорбции и, как следствие, увеличению свободной поверхности нанокристаллов и их дестабилизации с последующей агрегацией и образованием кластеров. Одновременное присутствие ОА и ДЭГ на поверхности кубических кластеров было подтверждено с помощью ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием. Несмотря на предложенную концепцию, авторы отмечают, что необходимо дальнейшее изучение механизма формирования кластеров путем самосборки отдельных НЧ для объяснения явления полной упорядоченности отдельных нанокристаллов.



А – сферические НЧ, полученные без добавления в реакционную смесь диолов, Б – димеры, образованные при добавлении ПЭГ ($M_w = 400$), В – олигомеры, образованные при добавлении ТЭГ, Г – кубические кластеры, полученные при добавлении ДЭГ, Д – схематическое изображение процесса замещения лигандов (синим показаны молекулы ОА, а красным – молекулы диолов)

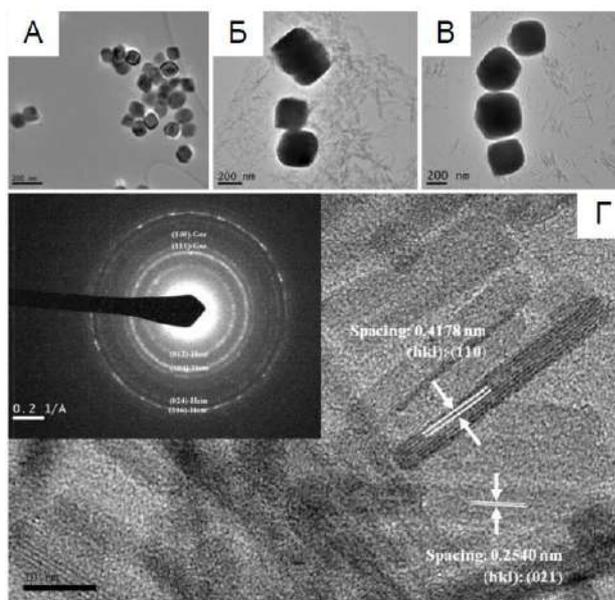
Рисунок 12 – ПЭМ-микрофотографии МНЧ оксида железа, синтезированных с использованием различных замещающих лигандов [40]

Таким образом, подводя итог данному разделу необходимо отметить, что кластерные МНЧ являются не до конца изученным, но весьма интересным и перспективным материалом, который может быть использован в качестве КА для повышения эффективности МРТ-визуализации опухолей различного типа. Однако, установление механизма образования нанокластеров до сих пор остается важной фундаментальной задачей. Кроме того, результаты измерений как удельной намагниченности насыщения, так и скорости r_2 -релаксации протонов

воды в зависимости от размера кластерных МНЧ сильно разнятся для различных исследований, в связи с чем необходимо проведение дополнительных экспериментов.

1.1.3 Стержневидные МНЧ

Стержневидные МНЧ оксидов железа являются одними из самых менее изученных, с точки зрения применения в биомедицине, из-за относительной сложности синтеза монодисперсных небольших по длине МНЧ и, в то же время, стабильных в физиологических условиях. Стержневидные МНЧ оксидов железа, как правило, имеют ферромагнитные свойства, что приводит к их агрегации даже в отсутствии внешних магнитных полей. С другой стороны, возможность контролируемого изменения аспектного соотношения стержневидных МНЧ в широком диапазоне, позволяет получать материалы с уникальными физическими свойствами (высокие значения коэрцитивности H_c , скорости r_2 -релаксации, SAR и т.д.). Совсем недавно было опубликовано несколько различных стратегий синтеза стержневидных НЧ оксидов железа. Так, М. Khalil с соавторами [48] синтезировали стержневидные НЧ гётита с длиной 150 нм при помощи гидротермального метода. Было показано, что увеличение концентрации железосодержащего прекурсора $FeCl_3$ в реакционной смеси при неизменной концентрации гидрата аммиака приводит к образованию стержневидных НЧ (Рисунок 13).



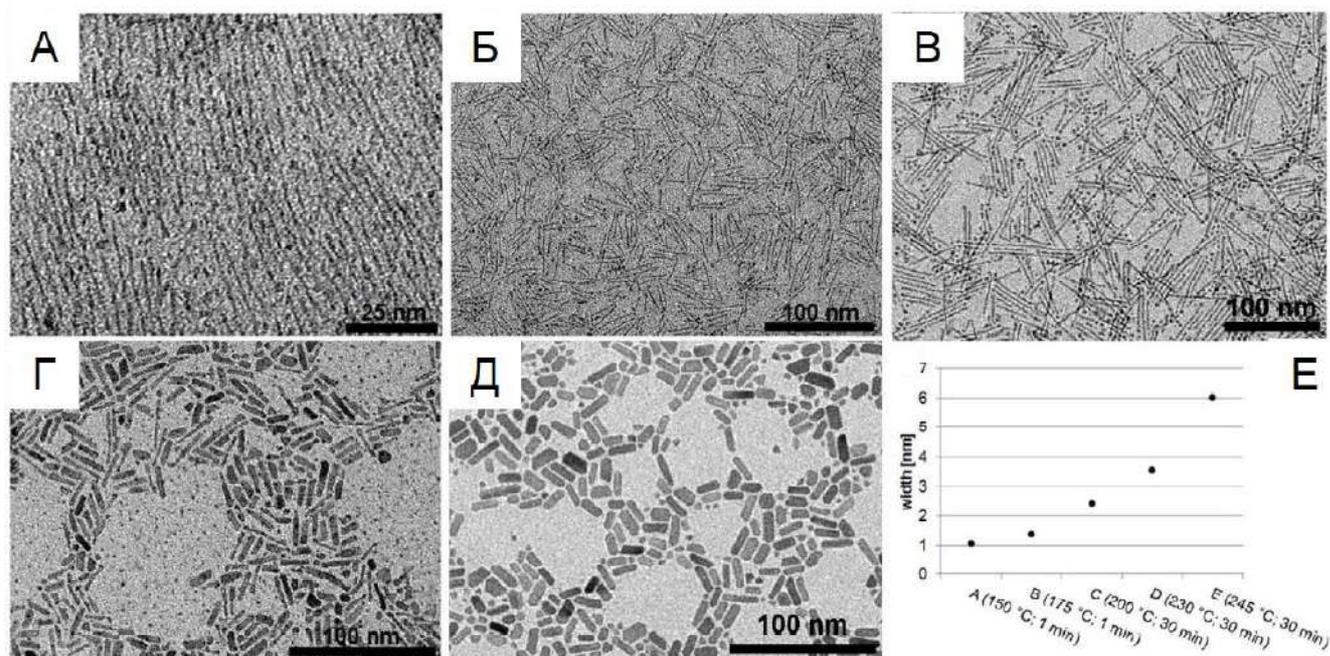
А – НЧ, полученные с использованием 16 мМ $FeCl_3$, Б – 40 мМ, В – 64 мМ (концентрация гидрата аммиака составляла 40 мМ, температура и продолжительность синтеза составляли

120 °С и 24 ч, соответственно), Г – ПЭМВР-микрофотография стержневидных НЧ и соответствующая электронограмма для образца Б

Рисунок 13 – ПЭМ-микрофотографии НЧ, синтезированных с использованием различных концентраций FeCl_3 [48]

Y. M. Zhao с соавторами [44] синтезировали монокристаллические гексагональные наностержни/наноленты гематита $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ микрометровой длины с диаметрами от 20 до 100 нм реакцией Fe с H_2O при температурах 350 – 450 °С. Несмотря на это, синтез магнитных стержневидных НЧ оксидов железа представляет собой отдельную задачу, в связи с тем, что такие МНЧ склонны к агрегации в процессе образования и роста кристалла с целью уменьшения поверхностной энергии. В связи с этим, необходимо обеспечивать стабилизацию таких МНЧ уже на стадии их зародышеобразования, при этом, стабилизирующий агент, как правило, должен также способствовать образованию стержневидной формы кристаллов.

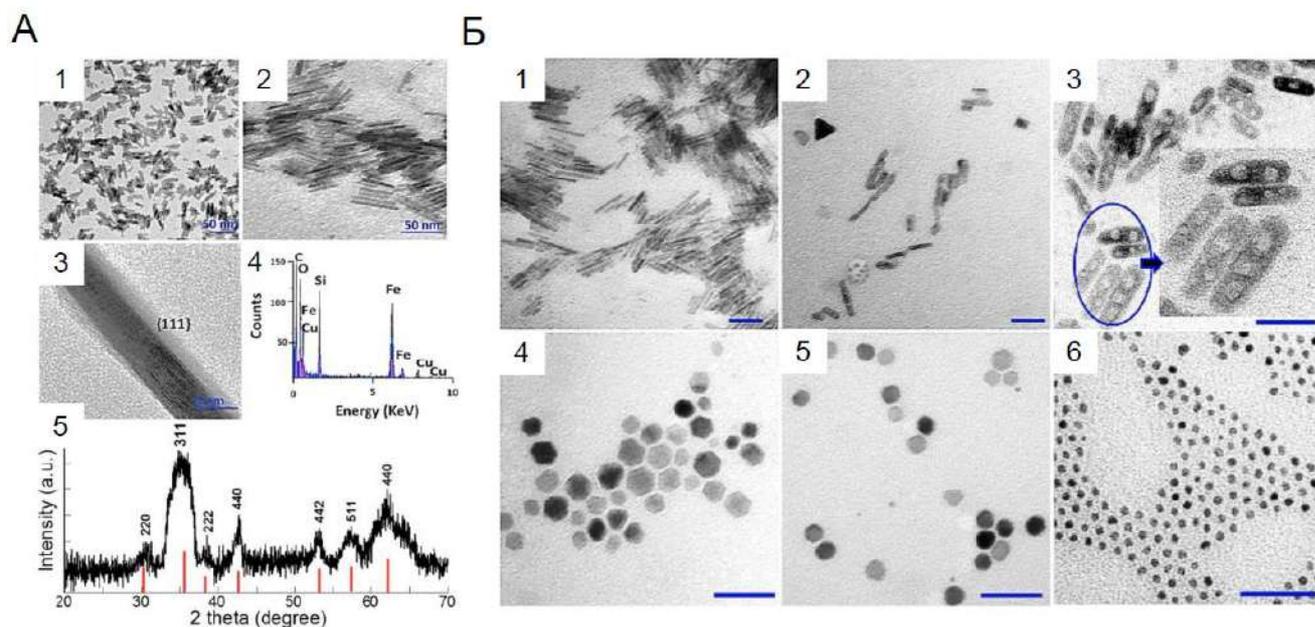
Так, Kloust Н. с соавторами [120] описали одностадийный способ получения стержневидных МНЧ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ из FeOL путем использования “шаблонного” метода, заключающегося в том, что летучие компоненты реакции, такие как этанол и вода, образуют матрицу в сочетании с ОА и олеиловым спиртом, обуславливающую образование стержневидной формы МНЧ. Диаметр стержневидных МНЧ возрастал как с увеличением продолжительности реакции, так и с увеличением температуры (Рисунок 14). Примечательно, что длина наностержней оставалась практически постоянной до температуры 200 °С. Таким образом, разработанный авторами синтетический подход позволяет контролировать аспектное соотношение стержневидных МНЧ путем выбора определенной температуры реакции.



А – 150 °С, Б – 175 °С, В – 200 °С, Г – 230 °С, Д – 245 °С, Е – диаграмма зависимости диаметра образующихся стержневидных МНЧ от продолжительности реакции и температуры

Рисунок 14 – Стержневидных МНЧ, синтезированные при различных температурах [120]

Для синтеза коротких стержневидных МНЧ может быть применен подход высокотемпературного термического разложения железосодержащих прекурсоров. Так, Orza A. с соавторами [89] описали способ получения стержневидных МНЧ реакцией $\text{Fe}(\text{acac})_3$ с ПЭИ ($M_w = 10000$ г/моль) в дифениловом эфире при 200 °С с добавлением OAm. Длина и диаметр, а также аспектное соотношение получаемых стержневидных МНЧ контролировались путем изменения реакционных параметров (Рисунок 15). К сожалению, авторы не описывают механизм формирования стержневидных МНЧ, однако отмечают ключевую роль температуры, при которой протекала реакция, демонстрируя, что ее повышение до 230 и 250 °С (Рисунок 15(1-2)) влечет за собой потерю стержневидной формы МНЧ. Кроме того, было показано, что концентрация OAm в реакционной смеси также влияет на то, какой формы получаются МНЧ. Например, мольное соотношение $\text{Fe}(\text{acac})_3/\text{OAm} = 1:7$ привело к образованию гексагональных МНЧ (Рисунок 15Б(4)) при соотношении 1:8 были получены 10 нм сферические МНЧ (Рисунок 15Б(5)), а соотношение 1:9 позволило получить 3,5 нм сферические МНЧ (Рисунок 15Б(6)).

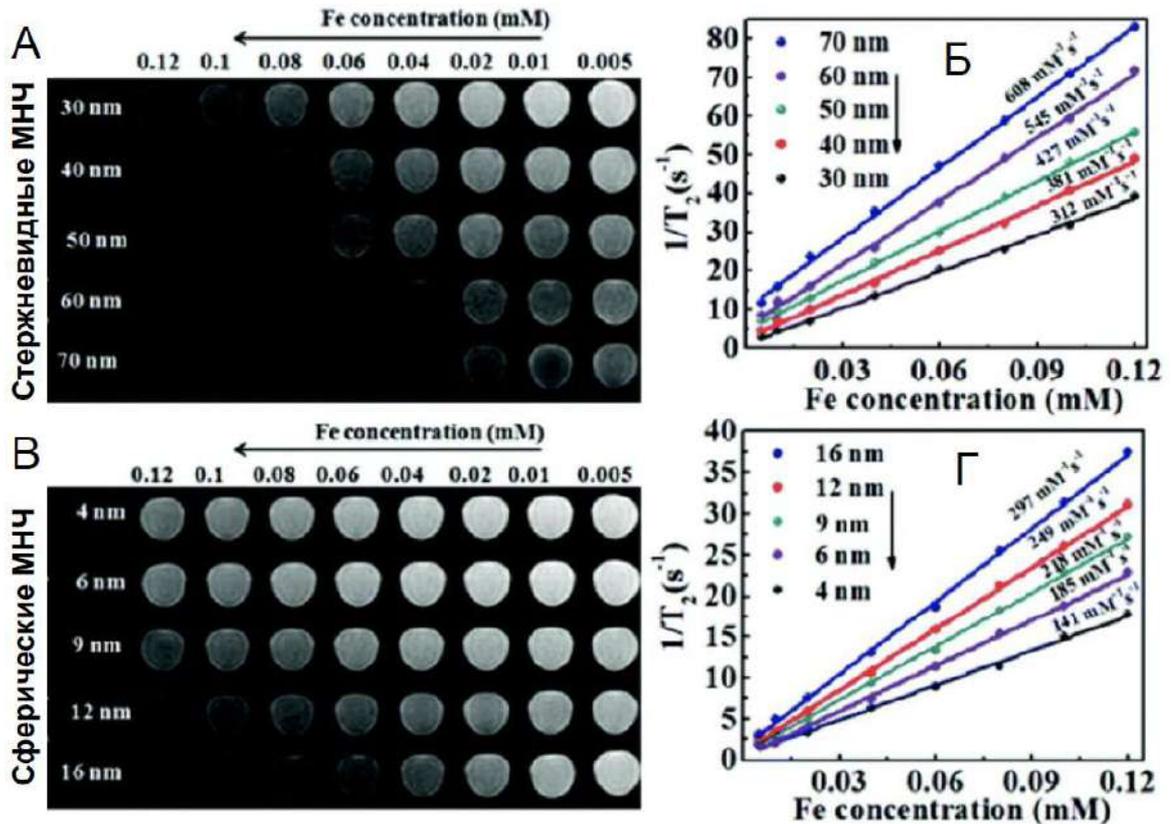


А – ПЭМ-микрофотографии стержневидных МНЧ 25×5 нм, синтезированных при добавлении в реакцию смесь 0,025 ммоль ПЭИ (1), 50×5 нм, синтезированных при добавлении в реакцию смесь 0,01 ммоль ПЭИ (2), ПЭМВР-микрофотография стержневидной наночастицы (шкала: 5 нм) (3), элементный анализ стержневидных МНЧ (4), рентгенограмма порошка МНЧ 50×5 нм (5), Б – ПЭМ-микрофотографии МНЧ, синтезированных при различных параметрах реакции (шкала: 50 нм)

Рисунок 15 – Структура и свойства стержневидны МНЧ [89]

Синтезированные стержневидные МНЧ оксида железа обладали более выраженными магнитными свойствами в сравнении с широко используемыми сферическими МНЧ оксида железа, что объясняется непосредственным влиянием аспектного соотношения МНЧ на их магнитные свойства. Значения удельной намагниченности насыщения МНЧ возрастали от 10 до 75 $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ с увеличением длины стержня от 25 до 50 нм. Кроме того, авторы продемонстрировали экстремально высокие значения r_2 -релаксации протонов воды в присутствии таких МНЧ, которые возрастали с 670,6 до 905,5 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ с увеличением длины стержня от 25 до 50 нм, что делает такие МНЧ весьма перспективным материалом для применения в качестве Т2-КА в МРТ-диагностике. В другой работе J. Mohapatra с соавторами [59] также использовали высокомолекулярный ПЭИ для синтеза стержневидных МНЧ с длиной от 30 до 70 нм. Однако, в начале авторами был синтезирован прекурсор – стержневидные НЧ акагениита ($\beta\text{-FeOOH}$), который затем восстанавливался до Fe_3O_4 в OAm при 200 °С. Для синтезированных стержневидных МНЧ были зарегистрированы значения параметра r_2 и

проведено сравнение с аналогичным параметром для сферических МНЧ с таким же объемом магнитного ядра (Рисунок 16).



А – T₂-взвешенные МР-изображения стержневидных МНЧ при различных концентрациях железа в приложенном магнитном поле с амплитудой $B = 3$ Т, Б – графики зависимости R₂-релаксивности протонов воды от концентрации стержневидных МНЧ, В – T₂-взвешенные МР-изображения сферических МНЧ при различных концентрациях железа в приложенном магнитном поле с амплитудой $B = 3$ Т, Г – графики зависимости R₂-релаксивности протонов воды от концентрации сферических МНЧ различных размеров

Рисунок 16 – МР-контрастный эффект от стержневидных МНЧ различной длины [59]

В результате было установлено, что стержневидные МНЧ позволяют получать значения r_2 в несколько раз превосходящие аналогичные значения для сферических МНЧ. Для получения стержневидных МНЧ также может быть применен подход с использованием микроволнового синтеза [37]. Для этого, в начале синтезируются немагнитные стержневидные НЧ, которые затем контролируемо восстанавливаются до γ -Fe₂O₃ или Fe₃O₄. При этом в качестве восстановителя, как правило, используются NaBH₄, LiAlH₄ или N₂H₄·H₂O. Особенностью синтеза НЧ с использованием микроволнового излучения является возможность

увеличивать скорость протекающих при этом химических реакций на несколько порядков, а также вызывать быстрый объемный нагрев образцов [53; 61].

1.2 Таргетинг МНЧ

Существуют два основных пути доставки МНЧ к интересующим мишеням при проведении *in vivo* экспериментов – активный и пассивный таргетинг [30]. Активный таргетинг МНЧ основан на функционализации МНЧ различными специфическими лигандами с высоким сродством к интересующей мишени, в роли которых выступают различные клеточные рецепторы [90; 145]. Еще один подход, который, однако, не получил широкого распространения из-за низкой эффективности, основан на использовании внешних магнитных полей, приложенных к интересующей области, в которой предпочтительно должно происходить накопление МНЧ. Пассивный таргетинг основывается на доставке МНЧ к интересующим мишеням путем изменения как размера магнитного ядра МНЧ, так и гидродинамического размера всей наноконструкции с учетом функционального покрытия. В этом случае принято говорить об эффекте повышенной проницаемости и удержания МНЧ в опухолевом микроокружении [5; 76; 84]. В нормальных сосудах поры в эндотелии имеют размер ~ 100 нм, тогда как в быстрорастущих и дефектных опухолевых сосудах это значение может достигать 2 мкм, что обеспечивает пассивное накапливание и удержание МНЧ в опухолевом микроокружении. Таким образом, изменяя размер МНЧ, можно контролируемо изменять среднюю продолжительность их циркуляции в кровотоке.

1.2.1 Липосомы и мицеллярные наноструктуры

Пассивный таргетинг МНЧ путем их инкапсуляции в липосомы (магнитолипосомы) или создания мицеллярных наноструктур, образованных амфифильными блок-сополимерами, обладает рядом несомненных преимуществ, главными из которых являются увеличенная продолжительность циркуляции МНЧ и хорошо изученные для таких наноструктур процессы фармакокинетики и фармакодинамики [36; 81]. Кроме того, магнитолипосомы или мицеллярные наноструктуры могут переносить как гидрофильные, так и гидрофобные МНЧ, что особенно важно для решения проблемы агрегации МНЧ в процессе их функционализации с целью солубилизации в физиологических растворах. Магнитолипосомы были неоднократно исследованы на применимость в качестве КА в МРТ-диагностике, где они зарекомендовали себя с наилучшей стороны [18; 36; 41; 109]. Мицеллярные наноструктуры, образованные

амфифильными блок-сополимерами, также зарекомендовали себя в качестве эффективной платформы для пассивной доставки МНЧ к интересующим мишеням [11; 95]. Чаще всего для этих целей используются блок-сополимеры торговой марки Pluronic®, которые отличаются друг от друга количеством полиоксипропиленовых (гидрофобных) и полиоксиэтиленовых (гидрофильных) звеньев, что обуславливает их различное сродство к водной фазе (Рисунок 17).

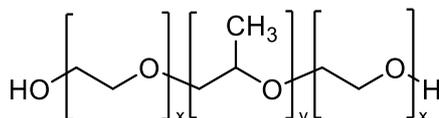


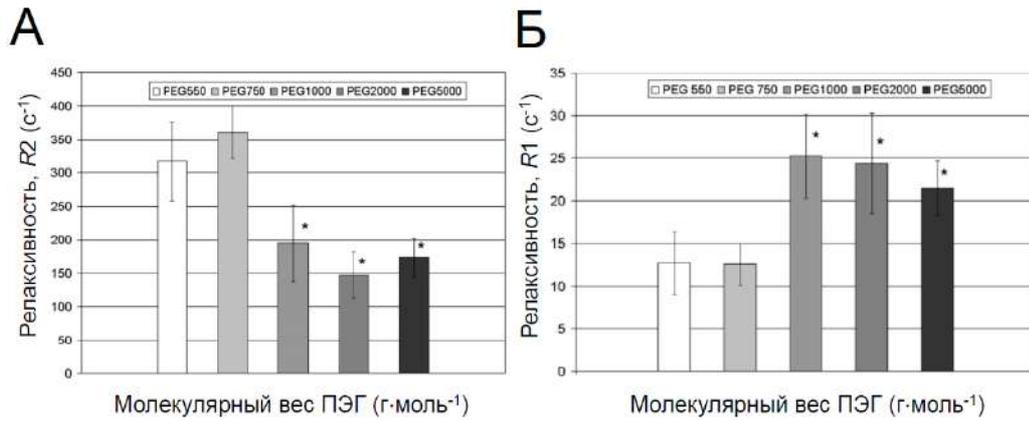
Рисунок 17 – Структурная формула блок-сополимера Pluronic. Для Pluronic F-68: $x = 80$; $y = 27$, а для Pluronic F-127: $x = 100$; $y = 65$.

Гидрофильные звенья таких сополимеров образуют “корону” вокруг МНЧ, которая предотвращает их агрегацию, адсорбцию белков, распознавание МНЧ ретикулоэндотелиальной системой и, как следствие, увеличивает время циркуляции таких МНЧ в сосудах [11; 95]. Кроме того, мицеллы на основе сополимеров Pluronic® способны повышать чувствительность мультирезистентных раковых клеток к противоопухолевой химиотерапии [11; 95]. Сополимеры Pluronic® имеют температурно-зависимые свойства [6]. При температурах ниже их критической температуры мицеллообразования (точка Крафта) весь полимер является гидрофильным. По мере того, как температура повышается и поднимается выше точки Крафта, полиоксипропиленовая цепь дегидратируется, становясь гидрофобной. Таким образом, полимер приобретает амфифильный характер, позволяющий ему самоорганизовываться в мицеллы. При еще более высоких температурах полиоксиэтиленовые цепи также становятся гидрофобными, что приводит к самоассоциации мицелл в растворе. Такие температурно-зависимые свойства Pluronic® могут быть эффективно использованы в адресной доставке различных низкомолекулярных препаратов в составе мицелл.

1.2.2 Конъюгаты МНЧ с производными ПЭГ

Функционализация МНЧ различными производными ПЭГ позволяет, с одной стороны, значительно повысить агрегативную устойчивость таких МНЧ в физиологических условиях и увеличить среднее время циркуляции МНЧ в кровотоке, а с другой – нацелить МНЧ на определенную мишень [99]. Функциональные покрытия на основе ПЭГ уменьшают неспецифическую адсорбцию белков крови на МНЧ, тем самым предотвращая распознавание

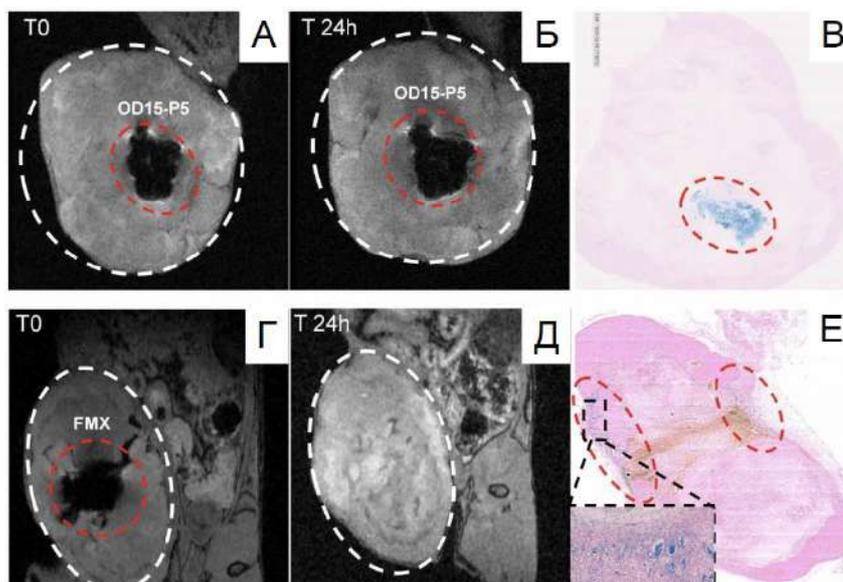
МНЧ ретикулоэндотелиальной системой и захват МНЧ макрофагами печени и селезенки [21; 99]. Хотя такие белки и способны связываться с ПЭГ-покрытиями, они сохраняют свою естественную конформацию, и системы распознавания не могут идентифицировать МНЧ как инородные тела. Так, например, ранее было продемонстрировано, что степень захвата макрофагами НЧ золота, модифицированных фосфатными группами, была снижена с 93 до 3,3% после дополнительной функционализации таких НЧ молекулами ПЭГ с $M_w = 10000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ [14]. Несколько ранних исследований также свидетельствуют о том, что ПЭГ-покрытие является ключевым фактором, обуславливающим накопление МНЧ в почках, предотвращая их захват макрофагами печени и селезенки [77; 92; 103; 121]. Однако, как на продолжительность циркуляции МНЧ, так и их захват макрофагами, также оказывают существенное влияние структура и молекулярная масса ПЭГ-покрытия. Так, в одной из работ было показано, что разветвленный ПЭГ за счет стерического эффекта более эффективно отталкивает молекулы различных белков, чем линейный ПЭГ [110]. При этом ПЭГ-покрытие может быть как нековалентно адсорбировано на поверхности МНЧ, так и быть ковалентно связанным с ней, а толщина покрытия может существенно влиять на соотношение $R2/R1$ релаксивности [25]. Понимание взаимосвязи между свойствами покрытия и изменениями релаксивности имеет решающее значение в разработке магнитных КА. Так, например, L.E.W. LaConte с соавторами [25] функционализировали 6,6 нм МНЧ магнетита фосфолипидными производными ПЭГ с $M_w = 550, 750, 1000, 2000$ и $5000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ и измерили времена $T1$ - и $T2$ -релаксации водных коллоидов на их основе. Полученные результаты показали, что значения $R2$ -релаксивности уменьшаются с увеличением молекулярной массы и линейного размера ПЭГ и, следовательно, с увеличением гидродинамического размера МНЧ (Рисунок 18). Самые высокие значения $R2$ наблюдались для МНЧ, функционализированных ПЭГ550 и 750 ($317 \pm 58,8 \text{ с}^{-1}$ и $360 \pm 40 \text{ с}^{-1}$, соответственно). Напротив, с увеличением молекулярной массы ПЭГ-покрытия величина параметра $R1$ возросла до максимального значения $\sim 25 \text{ с}^{-1}$ (Рисунок 18Б). Авторы смоделировали процессы диффузии молекул воды через оболочку из ПЭГ и показали, что процессы релаксации зависят не только от типа магнитного ядра МНЧ, но и от толщины органической оболочки, которая экранирует МНЧ и обуславливает сильную локальную неоднородность магнитного поля.



А – значения $R2$ -релаксивности (уровень значимости P : PEG1000, $P = 0,000192$; PEG2000, $P = 0,00027$; PEG5000, $P = 0,000289$ по отношению к PEG750), Б – значения $R1$ -релаксивности (уровень значимости P : PEG1000, $P = 0,00692$; PEG2000, $P = 0,018$; PEG5000, $P = 0,0045$). Результаты показаны как среднее \pm стандартное отклонение. Статистическая обработка данных проведена с помощью двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA)

Рисунок 18 – Влияние толщины ПЭГ-покрытия на значения релаксивности [25]

Авторы другой работы [127] синтезировали 15 нм МНЧ оксида железа, ковалентно-функционализированные ПЭГ с $M_w = 5000$ г·моль⁻¹ (OD15-P5) и провели сравнение физико-химических свойств полученных МНЧ с коммерческим КА Ferumoxytol. Результаты *in vitro* и *in vivo* МРТ-исследований на модели опухоли молочной железы человека MDAMB-231, привитой мышам, продемонстрировали наиболее выраженный контраст в случае использования для визуализации синтезированных МНЧ (Рисунок 19). Кроме того, концентрация синтезированных МНЧ OD15-P5 в опухоли оставалась неизменной даже через 24 ч после инъекции, в то время как коммерческие МНЧ Ferumoxytol полностью выводились из нее. Таким образом, полученные МНЧ могут применяться в качестве КА в МРТ-диагностике для долгосрочного мониторинга развития опухоли в реальном времени.



А – корональный срез T2-взвешенной 3D МРТ-области мышинной опухоли после инъекции OD15-P5, Б – корональный срез T2-взвешенной 3D МРТ-области мышинной опухоли через 24 ч после инъекции OD15-P5, В – окрашенные срезы опухоли через 24 ч после инъекции OD15-P5,

Г – корональный срез T2-взвешенной 3D МРТ-области мышинной опухоли после инъекции Ferumoxytol, Д – корональный срез T2-взвешенной 3D МРТ-области мышинной опухоли через 24 ч после инъекции Ferumoxytol, Е – окрашенные срезы опухоли через 24 ч после инъекции Ferumoxytol

Рисунок 19 – МРТ-изображения мышинной опухоли [127]

Как уже было отмечено выше, поверхностный заряд МНЧ, обусловленный терминальными группами лиганда, оказывает существенное влияние на фармакокинетику и фармакодинамику МНЧ. В исследовании [38] авторы дополнительно функционализировали МНЧ оксида железа, стабилизированные декстраном, молекулами ПЭГ, имеющими либо терминальные карбоксильные группы (отрицательно заряженные МНЧ), либо аминоксильные группы (положительно заряженные МНЧ), и продемонстрировали влияние заряда МНЧ на относительную экспрессию генов нескольких клеточных медиаторов. Заметное увеличение экспрессии генов *SCL-17* и *IL-10*, в большей степени, наблюдалось для МНЧ, стабилизированных декстраном, затем для МНЧ, функционализированных карбокси-производным ПЭГ и, в меньшей степени, для МНЧ, функционализированных аминоксильным производным ПЭГ. Однако в экспериментах по МРТ-визуализации легких, печени, селезенки и почек не было обнаружено никаких различий в контрастирующей способности разных типов МНЧ. Также не было обнаружено никаких признаков воспалительных реакций после инъекции МНЧ различного типа. Известно, что МНЧ вызывают генотоксические

эффекты, зависящие как от размера, так и поверхностного заряда МНЧ. Примечательно, что в данном исследовании пэгилированные МНЧ с отрицательным или положительным поверхностным зарядом показали значительно меньшее увеличение повреждения ДНК в сравнении с непэгилированными МНЧ. В отличие от оценки окислительного стресса, уровень которого находился на одинаковом значении для обоих типов пэгилированных МНЧ, оценка степени повреждения ДНК выявила более высокие значения для отрицательно заряженных МНЧ в сравнении с положительно заряженными.

1.3 Требования, предъявляемые к КА на основе МНЧ оксидов железа

При переходе от синтеза анизотропных МНЧ оксидов железа к их биомедицинскому применению, в частности в качестве КА в МРТ-диагностике, должен быть учтен ряд важных пунктов, а именно, необходимо, чтобы такие МНЧ не агрегировали в растворах, условия которых приближены к физиологическим, и обладали выраженными магнитными характеристиками. Агрегативная устойчивость МНЧ в растворах может контролироваться подбором лиганда, которым такие МНЧ функционализируются. В результате, за счет появления дополнительных стерических, а также электростатических факторов, функционализированные МНЧ способны не агрегировать даже при резком изменении ионной силы раствора [7]. При этом лиганд, которым функционализируются МНЧ, выступает также в роли оболочки, которая предотвращает прямой контакт магнитного железооксидного ядра МНЧ с окружающей средой и, как следствие, его окисление и захват макрофагами [51]. Немаловажным фактором, влияющим на продолжительность циркуляции МНЧ в кровотоке, являются их магнитные характеристики. Так, суперпарамагнитные МНЧ являются более предпочтительными КА, так как в отсутствие внешнего магнитного поля они не склонны к агрегации, как это характерно для крупных ферромагнитных МНЧ (с размером >100 нм). Форма и размер магнитного ядра (эффективный объем) МНЧ также играют ключевую роль в агрегативной устойчивости МНЧ и производимом ими контрасте. Построение МР-изображения при МРТ-диагностике производится тремя основными способами: 1) измерением концентрации протонов в интересующей области, 2) измерением времени спин-решеточной релаксации T_1 , 3) измерением времени спин-спиновой релаксации T_2 .

Так как концентрация протонов воды в исследуемых тканях остается практически неизменной, для усиления контраста применяют два основных типа КА (T_1 и T_2), которые повышают контраст за счет уменьшения соответствующих времен спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Эффективность КА принято сравнивать по соотношению R_2 - к R_1 -релаксивности, которые, в свою очередь, являются величинами, обратными временам T_2 - и

T1-релаксации, соответственно. Наибольшее внимание уделяется именно T2-КА, которые представлены, как правило, МНЧ оксидов железа (маггемита или магнетита), функционализированными различными защитными оболочками (Таблица 1).

Таблица 1 – Коммерческие контрастные агенты на основе МНЧ оксидов железа

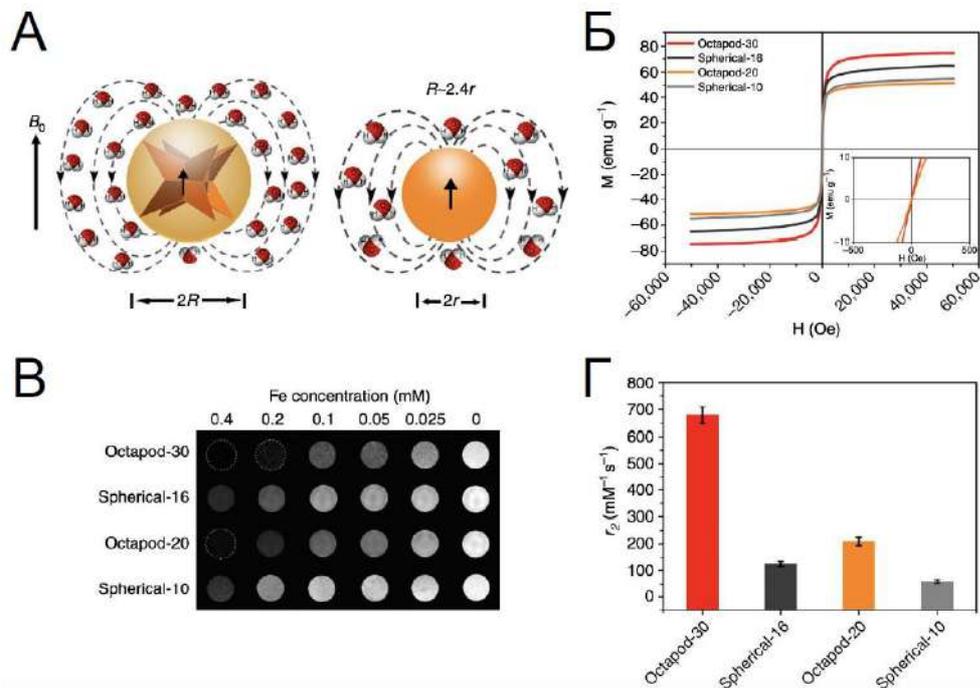
Состав/торговое название	Покрытие	Гидродинамический размер	r_1 (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	r_2 (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	Диагностика
Ferumoxil (AMI-121)/Lumirem (Guerbet), Gastromark (Advanced Magnetix)	Декстран	300	3,2	72	желудочно-кишечный тракт
Ferumoxide (AMI-25, SHU 555A)/Endorem (Guerbet), Feridex (Advanced Magnetix)		80 – 180	24	98	печень
Ferrixan (Ferucarbotran, SHU 555A)/Resovist (Schering); Cliavist (Medicadoc)		60	20	189	печень
Ferumoxtran-10 (AMI-227, BMS-180549)/Sinerem (Guerbet); Combidex (Advanced Magnetix)		20 – 40	22,7	78	печень, лимфатические узлы
Ferristene (OMP)/Abdoscan (GE-Healthcare)	Сульфированный сополимер стирола и дивинилбензола	300 (размер магнитных кристаллов <50 нм)	Нет данных	Нет данных	желудочно-кишечный тракт
Feruglose (PEG-feron, NC100150)/Clariscan (GE-Healthcare)	ПЭГилированный крахмал	20 (размер магнитных кристаллов 4-7 нм)	22	35	печень, лимфатические узлы

Согласно квантово-механической теории внешней сферы, R2-релаксивность сильно зависит как от значения удельной намагниченности насыщения J_S МНЧ, так и от эффективного радиуса r магнитного ядра МНЧ [43; 47]. В режиме средней подвижности, в котором все МНЧ представляются в виде сфер [4; 17], скорость r2-релаксации определяется следующим выражением [24]:

$$r_2 = \frac{256\pi^2\gamma^2}{405} \frac{kJ_S^2 r^2}{D(1 + L/r)} \quad (1)$$

где J_S и r – намагниченность насыщения и эффективный радиус МНЧ, соответственно, D – коэффициент диффузии молекул воды, L – толщина непроницаемого поверхностного покрытия, k – коэффициент пересчета ($k = V^*/C_{Fe}$, V^* – объемная доля, C_{Fe} – концентрация Fe).

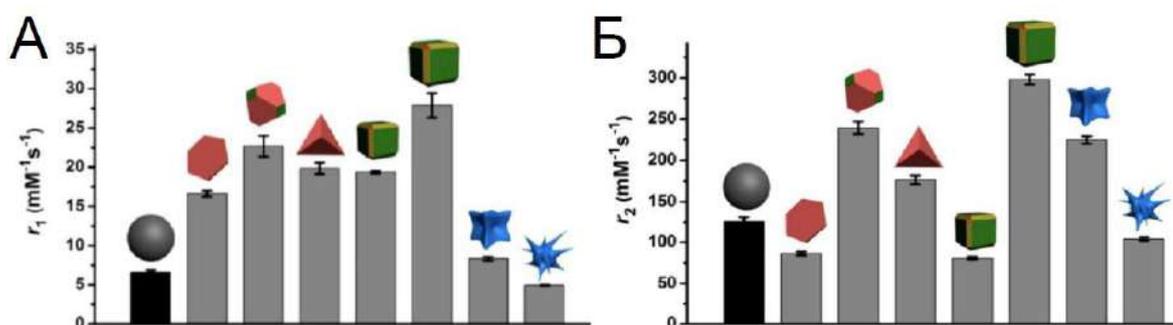
Согласно данному уравнению, можно предсказать, что более высокие значения J_S или больший эффективный радиус магнитного ядра МНЧ приведут к более высоким значениям r_2 . Несмотря на то, что значение J_S для объемных материалов является постоянной величиной (например, $J_S = 92 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ для объемного магнетита при $T = 300 \text{ K}$), можно достичь гораздо более высокой R_2 -релаксивности, увеличив эффективный радиус магнитного ядра МНЧ, который в значительной степени зависит от морфологии МНЧ. Так, например, эффективный радиус R МНЧ оксида железа в виде октапода в 2,4 раза больше, чем радиус r сферических МНЧ, при одинаковом геометрическом объеме их магнитного ядра [87] (Рисунок 20).



А – схематическое изображение шарообразной модели октапода и сферической МНЧ оксида железа с одинаковыми геометрическими объемами (черные пунктирные линии показывают локальное магнитное поле октапода и сферической МНЧ, а одинаковая длина черной стрелки означает одинаковую намагниченность насыщения J_S МНЧ), Б – кривые намагничивания октаподов и сферических МНЧ оксида железа с различным размером, измеренные при $T = 300 \text{ K}$, В – T2-взвешенные МР-изображения МНЧ в 1% водном растворе агарозы при различных концентрациях железа, Г – сравнение значений параметра r_2 для различных МНЧ

Рисунок 20 – Сравнение свойств октапода и сферической МНЧ оксида железа [87]

Из-за необычной морфологии анизотропных МНЧ, локальное магнитное поле, индуцированное ими под действием внешнего магнитного поля, может быть более неоднородным, чем в случае сферических МНЧ. Такое локальное поле может дополнительно вызывать дефазирование протонов и сокращать время T2-релаксации [15]. Другим ярким примером превосходства физических свойств анизотропных МНЧ оксидов железа над аналогичными свойствами МНЧ любых других форм является работа [8], в которой было показано, что кубические МНЧ оксида железа проявляют самый высокий T1- и T2-контраст (Рисунок 21). Значение r_2 для кубических МНЧ с размером ребра 21 нм составило $298,02 \pm 5,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, а для октапедов с размером ребра 45 нм – $224,37 \pm 4,58 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ при напряженности поля $B = 0,5 \text{ Тл}$.



А – значения параметра r_1 , Б – значения параметра r_2 , показывающие, что релаксивность МНЧ связана не только со значением J_s , но и с эффективными радиусами МНЧ

Рисунок 21 – Сравнение параметров релаксивности для различных типов анизотропных МНЧ оксидов железа [8]

Таким образом, изменяя форму магнитного ядра МНЧ можно контролируемо управлять их статическими и динамическими магнитными свойствами, получая, в конечном итоге, КА, обладающие высокими значениями R_1 - или R_2 -релаксивности.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и методы

Ацетилацетонат железа (III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$; $\geq 99,9\%$), хлорид железа (III) (FeCl_3 ; 97%), 1,2-гексадекандиол (1,2-ГДД, 90%), циклопропанкарбоновая кислота (95%), циклобутанкарбоновая кислота (98%), циклопентанкарбоновая кислота (99%), циклогексанкарбоновая кислота (98%), бензойная кислота ($\geq 99,5\%$), бифенил-4-карбоновая кислота (95%), олеиновая кислота (ОА, 90%), олеиламин (ОАм, 70%), дибензиловый эфир ($\geq 98\%$), 1-октадецен ($\geq 95\%$), разветвленный полиэтиленимин (ПЭИ, $M_w = 25000 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$), гидрат гидразина ($\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 50 – 60%), гидроксид натрия (NaOH , $\geq 97,0\%$), соляная кислота (HCl , 37%), азотная кислота (HNO_3 , 65%), этанол (95%), ацетон (99%), н-гексан ($\geq 98,0\%$), 2-пропанол ($\geq 99,8\%$), дихлорметан ($\geq 99,8\%$), хлороформ (99%), N,N-диметилформамид (ДМФА, 99,8%), диметилсульфоксид (ДМСО, 99,9%), метанол (99,8%), ацетат аммония (99,99%), гидрат натриевой соли 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-р,р'-дисульфоновой кислоты (феррозин, 97%), L-аскорбиновая кислота ($\geq 99,0\%$), Pluronic F-68 и F-127, N-гидроксисукцинимид (NHS, 98%), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC, $\geq 99,0\%$), безводный карбонат калия (K_2CO_3 ; $\geq 99\%$), 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (ДФУК, 98%) и поли(этилен гликоль) 2-аминоэтиловый эфир уксусной кислоты ($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$, $M_w \sim 1100 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$) были приобретены в компании Sigma-Aldrich. 6-Нитродофамин (DOPA) был приобретен в компании Toronto Research Chemicals. 1-Инданкарбоновая кислота (95%) и олеат натрия (NaOL , 95%) были приобретены в компании ABCR GmbH & Co. KG. Флуоресцентный краситель Цианин-5-амин (Cy5) был приобретен в компании Lumiprobe. 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолиум (MTS) был приобретен в компании Promega (США). Все приобретенные реагенты использовались без какой-либо дополнительной очистки. Деионизированная вода была получена с помощью системы очистки Millipore Milli-Q Academic System.

Микрофотографии наночастиц и срезов тканей были получены на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) JEOL JEM-1400 при ускоряющем напряжении 120 кВ. Микрофотографии высокого разрешения были получены на ПЭМ JEOL JEM-2100 при ускоряющем напряжении 200 кВ. Количественную оценку размера наночастиц осуществляли с использованием программного обеспечения ImageJ.

Рентгеноструктурный анализ сухих порошков НЧ осуществляли при комнатной температуре с использованием дифрактометра DRON-4 с Co K_α излучением. Сбор данных

производился при значениях угла дифракции $2\theta = 20 - 100^\circ$ при скорости сканирования 0.1° за шаг и 3 с на одну точку. Качественный фазовый анализ был проведен путем сравнения полученных результатов с базой данных PHAN.

Кривые намагничивания и петли гистерезиса были зарегистрированы с использованием многофункционального автоматизированного комплекса Quantum Design PPMS DynaCool, оснащенного опцией виброметрической магнитометрии (VSM).

Термогравиметрический анализ порошков НЧ был осуществлен на синхронном термогравиметрическом анализаторе Netzsch STA 449 F3. Порошки НЧ помещались в корундовые тигли и нагревались до 700°C со скоростью $10^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ в атмосфере аргона.

ИК-спектры с Фурье преобразованием порошков НЧ были зарегистрированы на приборе Nicolet 380 instrument (Thermo Scientific, США) в диапазоне волновых чисел от 400 до 4000 см^{-1} методом прессования таблеток с KBr.

Изучение гидродинамических параметров НЧ в растворах, а также измерение поверхностного заряда НЧ осуществляли на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern) при концентрации Fe в образец НЧ равной $0,2\text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$.

Мёссбауэровские спектры образцов НЧ были зарегистрированы с помощью электродинамического спектрометра CMS-1104Em, работающего в режиме постоянного ускорения. В качестве источника резонансного γ -облучения использовался ^{57}Co в родиевой матрице. Сдвиги изомеров определяли относительно $\alpha\text{-Fe}$.

Спектрофотометрические исследования проводились на спектрометре Thermo Scientific Multiskan GO spectrometer. Флуориметрические исследования осуществлялись на флуориметре PerkinElmer EnSpire 2300 Multimode Plate. Количественная оценка Fe в образцах НЧ проводилась с помощью:

1) атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) на приборе Agilent 4200 MP-AES с использованием стандартной калибровочной кривой в диапазоне концентраций $[\text{Fe}] = 0,1 - 2,0\text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$. Для этого 10 мкл водного коллоида НЧ растворяли в 90 мкл концентрированной HCl в течение 20 мин, после чего полученный раствор дополнительно разбавляли в 10^4 раз деионизированной водой и анализировали методом АЭС.

2) колориметрической реакцией с феррозином с использованием стандартной калибровочной кривой. Для этого 10 мкл раствора НЧ растворяли в 90 мкл концентрированной HCl в течение 20 мин, после чего полученный раствор разбавляли в 500 раз деионизированной водой и анализировали интенсивность поглощения света при длине волны 560 нм.

Изучение динамических магнитных свойств (скорость T_2 -релаксации) водных коллоидов НЧ осуществляли при 18°C с использованием МР-томографа ClinScan 7T MRI. Получение изображений производилось в режиме Spin Echo со следующими параметрами: TR = 10000 мс,

TE = 8, 16, 24, 240 мс, угол 180 °, разрешение 640 × 448 пикселей, поле зрения FOV = 120 × 82,5 мм². Интенсивности сигналов интересующих областей были измерены вручную с помощью программного обеспечения ImageJ, а время релаксации T2 было рассчитано путем подгонки сигнала из изображений с различными TE. Значения R2-релаксивности рассчитывали с использованием линейной подгонки времен релаксации 1/T2 к концентрации железа.

Для интравитальной микроскопии (ИВМ) почек мышей использовался конфокальный микроскоп Nikon AR1 и флуоресцентно-меченные антитела (Ly6G BV-421, F4/80 Alexa-488 или CD45 FITC, CD11b PE или CD49b PE, Biolegend®). После ИВМ экспериментальных животных подвергали эвтаназии и производили забор органов.

Клетки рака молочной железы мыши (4T1), колоректального рака (CT26) и меланомы (B16) были приобретены в компании ATCC, Manassas, VA, (США). Для количественной оценки цитотоксичности наночастиц, клетки инкубировали с НЧ (0 – 200 мкг Fe₃O₄·мл⁻¹), а также свободным красителем Cy5 (0,03 – 7,84 мкг·мл⁻¹). 20 мкл реагента MTS (анализ нерадиоактивной пролиферации клеток CellTiter 96 AQueous, Promega, США) добавляли в каждую лунку со 100 мкл культуральной среды и после 4 ч инкубации при 37 °С в темноте измеряли поглощение при 490 нм с использованием спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan GO. Каждый эксперимент проводился трижды.

Протоколы экспериментов, включающие исследования биораспределения НЧ и ИВМ на экспериментальных животных, были одобрены Комитетом по уходу за животными Российским национальным исследовательским медицинском университетом им. Н.И. Пирогова. Самки мышей BALB/c в возрасте от шести до восьми недель были получены из Андреевского центра животных (Андреевка, Россия). Во время проведения исследований животные были в возрасте от 7 до 11 недель и весили 20 – 22 г.

Для исследования *in vivo* токсичности НЧ животным вводили внутривенно коллоидный раствор НЧ или PBS (контроль) и контролировали массу тела животных и их поведение в течение 14 дней. Для исследований биораспределения животным вводили внутривенно НЧ с концентрацией 5 мг Fe₃O₄·мл⁻¹. После эвтаназии животных собирали печень, селезенку, почки, легкие и сердце, взвешивали и растворяли в царской водке в течение 24 часов. Количественную оценку концентрации железа проводили с помощью АЭС. Обработанных PBS животных использовали в качестве контроля для измерения уровней эндогенного железа. Выявление НЧ в моче экспериментальных животных проводилось путем введения высокой дозы НЧ (50 мг Fe₃O₄·мл⁻¹). Мочу собирали в течение 2 часов после инъекции, а концентрацию железа измеряли с помощью АЭС, как описано выше. Процент экскретированной дозы на основе железа рассчитывали с использованием индивидуальных концентраций и среднего

уровня эндогенного железа в группе, получавшей PBS. Для учета различий в объеме мочи между животными результаты были представлены в виде % введенной дозы/мл мочи.

2.2 Синтез образцов КНЧМ-10, КНЧМ-15, КНЧМ-20 и КНЧМ-30 из олеатного комплекса железа (III)

Кубические НЧ магнетита различного размера были синтезированы термическим разложением предварительного полученного олеатного комплекса железа (III) (FeOL). Для синтеза FeOL 1,5 ммоль NaOL было растворено в смеси 10 мл деионизированной воды, 10 мл этанола и 20 мл н-гексана. Далее к полученному раствору было добавлено 0,5 ммоль безводного FeCl₃, полученная смесь была нагрета в атмосфере аргона до температуры кипения при непрерывном перемешивании и выдерживалась при данной температуре в течение 4 ч. По окончании реакции полученная смесь была охлаждена до комнатной температуры и перенесена в делительную воронку для отделения образовавшегося темно-коричневого слоя, который затем был промыт смесью деионизированной воды и этанола (v/v=1:1; 3×50 мл) и высушен при пониженном давлении с использованием вакуумного роторного испарителя.

Для синтеза кубических НЧ магнетита 1,3 ммоль NaOL и 1,3 ммоль ОА было растворено в 33 мл 1-октадецена, в то время как количество (FeOL) варьировалось. Полученная смесь была предварительно нагрета до 140 °С в атмосфере аргона и выдерживалась в течение 1 ч при непрерывном перемешивании для удаления следовых количеств воды и полного растворения всех компонентов. Далее, раствор был нагрет до температуры 312 °С со скоростью 4 °С·мин⁻¹ и выдерживался при данной температуре в течение 30 мин. По окончании реакции, коллоидный раствор был охлажден до комнатной температуры, а полученные КНЧМ были выделены путем добавления к раствору 2-пропанола (20 мл) и последующего центрифугирования (14000 об·мин⁻¹, 1 ч). После центрифугирования осадок из КНЧМ был редиспергирован в 30 мл н-гексана или хлороформа.

2.3 Синтез образца КНЧМ-30 из ацетилацетоната железа (III)

Смесь Fe(асас)₃ (0,5 ммоль), 1,2-ГДД (4 ммоль), ОА (8 ммоль), ОАм (2 ммоль) и дибензиолового эфира (10 мл) была предварительно нагрета до 130 °С в токе аргона при непрерывном перемешивании и выдерживалась при данной температуре в течение 1 ч. Далее раствор был нагрет до температуры кипения (296 °С) со скоростью 3 °С·мин⁻¹ и выдерживался в течение 4 ч. По окончании реакции, коллоидный раствор наночастиц был охлажден до комнатной температуры, а сами наночастицы были выделены путем центрифугирования

(6000 об·мин⁻¹, 30 мин) после добавления 10 мл смеси 2-пропанол – н-гексан ($v/v = 1/1$) и ретиспергированы в 20 мл ДХМ.

2.4 Синтез образцов КлНЧМ

Смесь $\text{Fe}(\text{асас})_3$ (2 ммоль), 1,2-ГДД (8 ммоль) и различных органических кислот в дибензиловом эфире (20 мл) была предварительно нагрета до 130 °С в токе аргона при непрерывном перемешивании и выдерживалась при данной температуре в течение 1 ч. Далее раствор нагревали до 210 °С со скоростью 5 °С·мин⁻¹ и выдерживали при данной температуре в течение 1 ч, после чего нагревали до 260 °С с аналогичной скоростью и выдерживали еще в течение 30 мин. По окончании реакции, коллоидный раствор наночастиц был охлажден до комнатной температуры, а сами наночастицы были выделены путем центрифугирования (6000 об·мин⁻¹, 30 мин) после добавления 10 мл смеси 2-пропанол – н-гексан ($v/v = 1/1$) и ретиспергированы в 20 мл ДХМ.

2.5 Синтез образца СНЧМ N-1

Прекурсор – стержневидны НЧ акагенита ($\beta\text{-FeOОН}$), были синтезированы гидролизом FeCl_3 с добавлением высокомолекулярного ПЭИ ($M_w = 25$ кДа). Для этого, 2 мл ПЭИ растворяли в 100 мл деионизированной воды, после чего к полученному раствору добавляли 2,54 г FeCl_3 . Далее раствор нагревали до 80 °С при непрерывном перемешивании и выдерживали при данной температуре в течение 2 ч, после чего охлаждали до комнатной температуры и доводили значение рН до 7,0 при помощи 1М NaOH. Образовавшийся осадок наночастиц отделяли путем центрифугирования (6000 об·мин⁻¹, 30 мин) и промывали деионизированной водой (3 × 50 мл) с использованием центрифужных фильтров.

Затем коллоидный раствор стержневидных НЧ $\beta\text{-FeOОН}$ ($[\text{Fe}] = 3$ мг·мл⁻¹) смешивали с гидразин гидратом, и полученную смесь помещали в герметичную ампулу, которую, в свою очередь, помещали в реактор микроволнового синтеза (Anton Paar-Monowave 300) и подвергали различному количеству циклов микроволнового облучения (каждый цикл включал нагрев раствора до 100 °С, удержание температуры в течение 30 сек и охлаждение до 35 °С). Полученные СНЧМ отделяли от раствора путем центрифугирования (6000 об·мин⁻¹, 10 мин) и промывали деионизированной водой (3 × 50 мл) с использованием центрифужных фильтров.

2.6 Синтез образца СНЧМ D-1

Прекурсор – стержневидны НЧ акагенита (β -FeOOH), были синтезированы гидролизом FeCl₃ в присутствии DOPA. Для этого, 10 мл 0,05 М водного раствора FeCl₃ с смешивали с 1 мл водного раствора DOPA (1,6 мг·мл⁻¹), после чего к полученному раствору добавляли 180 мл деионизированной воды с температурой 80 – 90 °С. Реакционную смесь выдерживали при 90 °С в течение 2 ч при непрерывном перемешивании, после чего ее охлаждали до комнатной температуры. Для выделения образовавшегося прекурсора рН коллоидного раствора увеличивали до 7,4 путем добавления 1М NaOH, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (6000 об·мин⁻¹, 10 мин) и промывали деионизированной водой (3 × 50 мл) с использованием центрифужных фильтров (Millipore® Amicon Ultra-4, 30 кДа).

Затем коллоидный раствор стержневидных НЧ β -FeOOH ([Fe] = 3 мг·мл⁻¹) смешивали с гидразин гидратом, и полученную смесь помещали в герметичную ампулу, которую, в свою очередь, помещали реактор микроволнового синтеза (Anton Paar-Monowave 300) и подвергали различному количеству циклов микроволнового облучения (каждый цикл включал нагрев раствора до 100 °С, удержание температуры в течение 30 сек и охлаждение до 35 °С). Полученные СНЧМ отделяли от раствора путем центрифугирования (6000 об·мин⁻¹, 10 мин) и промывали деионизированной водой (3 × 50 мл) с использованием центрифужных фильтров.

2.7 Функционализация НЧ блок-сополимерами Pluronic (НЧ@Pluronic)

Блок-сополимер Pluronic (1,6 мкмоль) был растворен в деионизированной воде (4 мл), после чего к полученному раствору было добавлено 2 мл НЧ в н-гексане ([Fe] = 2,5 мг·мл⁻¹). Полученный двухфазный раствор перемешивался в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего функционализированные НЧ@Pluronic были выделены центрифугированием (14000 об·мин⁻¹, 90 мин) и редиспергированы в деионизированной воде. Центрифугирование и редиспергирование НЧ@Pluronic было проведено несколько раз для очистки наночастиц от избытка сополимера.

2.8 Функционализация НЧ лигандом на основеДФУК и производного аминокарбокси-ПЭГ (НЧ-ПЭГ-СООН)

24 мг NaOH было растворено в 10 мл MeOH, после чего к полученному раствору добавляли 51 мг ДФУК. Далее к полученному раствору добавляли 10 мл НЧ, стабилизированных олеиновой кислотой, в н-гексане ([Fe] = 1 мг·мл⁻¹), после чего раствор

инкубировали при 50 °С при интенсивном перемешивании в течение 12 ч. По окончании реакции функционализированные НЧ-ДФУК были выделены из раствора путем центрифугирования (6000 об·мин⁻¹, 20 мин), промыты 10 мл MeOH и редиспергированы в 10 мл деионизированной воды. Для удаления непрореагировавших веществ, полученный водный раствор НЧ-ДФУК промывали деионизированной водой с использованием центрифужных фильтров (Millipore® Amicon Ultra-4, 30 кДа). Затем, к 1 мл НЧ-ДФУК ([Fe] = 1 мг·мл⁻¹) добавляли 14 мкл EDC (10 мг·мл⁻¹) и 8 мкл NHS (10 мг·мл⁻¹) и перемешивали полученный раствор в течение 20 мин. Далее к раствору добавляли 100 мкл NH₂-PEG-COOH (100 мг·мл⁻¹, $M_w \sim 1100$ г·моль⁻¹) и перемешивали полученную смесь в течение 24 ч. Модифицированные НЧ-ПЭГ-COOH были выделены и очищены от избытка непрореагировавших веществ путем диализа против воды в течение 48 ч в диализных мешках с размером пор 50 кДа.

2.9 Функционализация НЧ флуоресцентным красителем цианин-5-амин (НЧ-ПЭГ-CONH-Cy5)

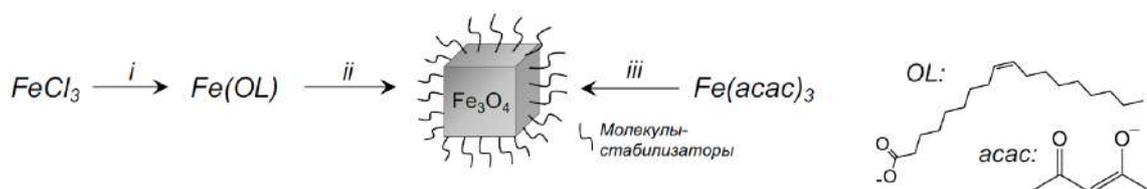
К 1 мл водного раствора НЧ-ПЭГ-COOH ([Fe] = 1 мг·мл⁻¹) добавляли 14 мкл EDC (10 мг·мл⁻¹) и 8 мкл NHS (10 мг·мл⁻¹) и перемешивали полученный раствор в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее к раствору добавляли 10 мкл раствора Cy5 (110 мкМ) в ДМСО и перемешивали полученный раствор в течение 24 ч. Очистку НЧ-ПЭГ-CONH-Cy5 от непрореагировавших веществ осуществляли диализом против воды в течение 48 ч.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Синтез и исследование физических свойств НЧ

3.1.1 Разработка методики синтеза кубических наночастиц магнетита (КНЧМ)

Основой разрабатываемой методики синтеза КНЧМ послужил метод термического разложения предварительного синтезированного комплекса олеата железа FeOL, а также коммерчески доступного ацетилацетоната железа (III) (Fe(acac)₃) в 1-октадецене (314 °C) или дибензиловом эфире (296 °C), соответственно (см. раздел III) (Рисунок 22).



Реагенты и условия: (i) NaOL, *n*-C₆H₁₄/EtOH/H₂O, 80°C, 4 ч, (ii) ОА, NaOL, 1-октадецен, Ar, 314 °C, (iii) ОА, OAm, 1,2-ГДД, дибензиловый эфир, Ar, 296 °C

Рисунок 22 – Схематическое изображение методики синтеза КНЧМ

Так, в ходе проведения экспериментов было установлено, что способ получения FeOL напрямую влияет на форму образующихся МНЧ. Синтез FeOL в системе растворителей *n*-C₆H₁₄/H₂O/MeOH и его последующее термическое разложение в 1-октадецене привели к образованию полидисперсных НЧ со стержневидной морфологией (Рисунок 23). Вероятнее всего, полученный результат обусловлен именно влиянием MeOH на структуру получаемого комплекса FeOL. Ранее было показано, что стадия очистки FeOL от побочных продуктов реакции путем его промывки различными растворителями, а также стадия последующего высушивания значительно влияют на состав и структуру получаемого комплекса, что, в свою очередь, влечет за собой изменения кинетики реакции термического разложения FeOL [52]. Так, например, в работе [26] было показано, что интенсивная промывка FeOL при помощи MeOH и его последующее термическое разложение могут привести к формированию стержневидных НЧ с различным аспектным соотношением. При этом в получаемом карбоксилате преобладает мостиковая координация ионов Fe с олеат-ионами (Рисунок 23), которая обуславливает поперечный рост зародышей НЧ.

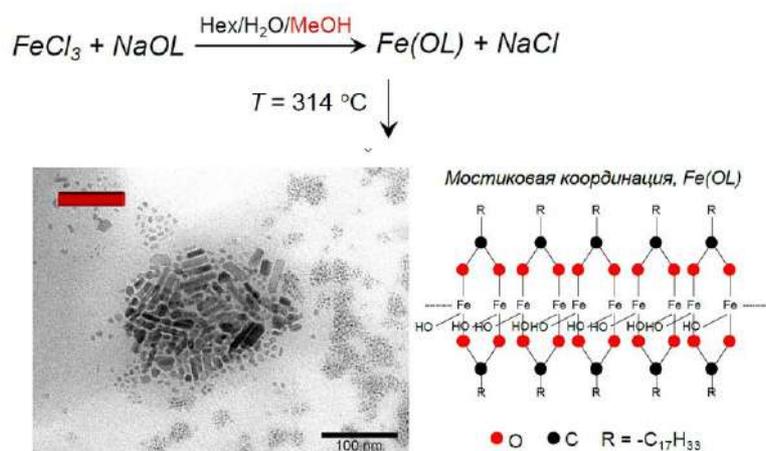


Рисунок 23 – Схема реакции получения FeOL и микрофотография НЧ, синтезированных при его термическом разложении

Нами также был осуществлен синтез FeOL в системе растворителей *n*-C₆H₁₄/H₂O/EtOH. В этом случае термическое разложение полученного комплекса в 1-октадеcene привело к формированию кубических НЧ (Рисунок 24). Методом ИК-спектроскопии и на основании ранее опубликованных работ [26; 52], было установлено, что использование EtOH в качестве растворителя приводит к тому, что в получаемом FeOL преобладает бидентатная координация ионов Fe с олеат-ионами (Рисунок 24), что в свою очередь, обуславливает формирование именно кубических НЧ.

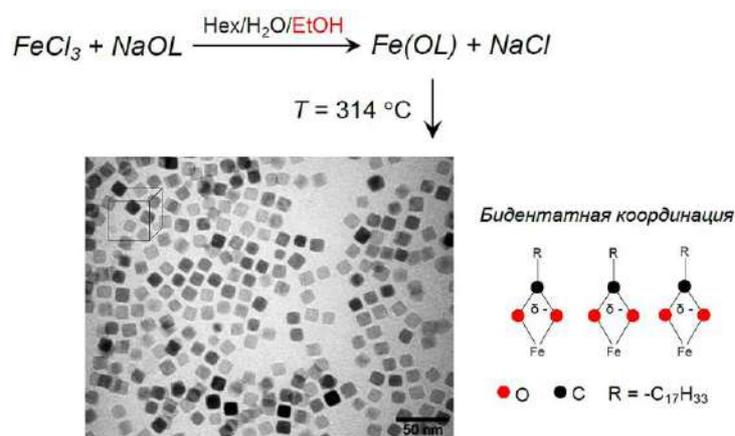


Рисунок 24 – Схема реакции получения FeOL и микрофотография НЧ, синтезированных при его термическом разложении

В ходе проведения экспериментов по изучению влияния реакционных параметров и этапов очистки FeOL от побочных продуктов на морфологию получаемых НЧ, было обнаружено, что исключение этапа промывки FeOL водой привело к образованию НЧ с вогнутыми гранями (Рисунок 25). Вероятнее всего, такой результат обусловлен влиянием именно ионов Cl⁻ в составе NaCl на формирование и рост НЧ. В процессе синтеза FeOL образуется избыточное количество NaCl, который не удаляется из конечного продукта в случае использования только абсолютного EtOH на стадии очистки.

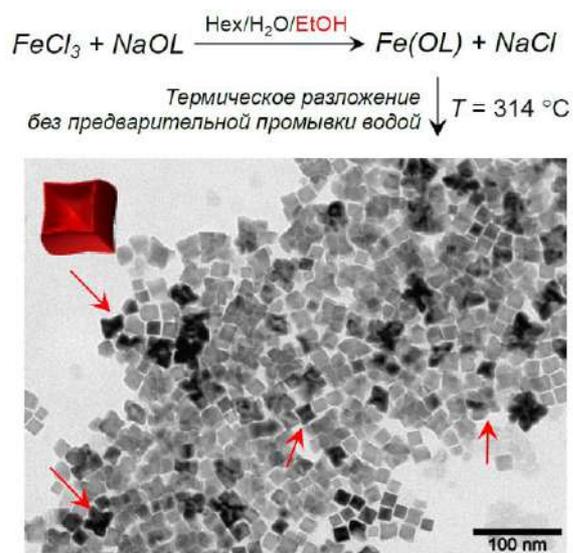


Рисунок 25 – ПЭМ-микрофотография КНЧМ с вогнутыми гранями

Ионы Cl⁻ избирательно связываются с ионами Fe на плоскостях (311) растущих кристаллов НЧ и, тем самым, блокируют их дальнейший рост в данном направлении, что приводит образованию вогнутых граней у получаемых НЧ. Данная теория была подтверждена в работе [87], где авторы синтезировали МНЧ оксидов железа в форме октаподов термическим разложением FeOL с добавлением NaCl. При этом авторы продемонстрировали, что использование NaF или KBr вместо NaCl не приводит к образованию подобных МНЧ, тогда как замена NaCl на KCl и гексадецилтриметиламмонийхлорид позволяет получать МНЧ в форме октаподов, что подтверждает ключевую роль ионов Cl⁻ в формировании подобных наноструктур.

Таким образом, для получения именно кубических наночастиц магнетита, нами была проведена тщательная отмывка предварительно синтезированного FeOL, как EtOH, так и деионизированной водой с целью обессоливания. На основании проведенного литературного обзора также было установлено, что контроль за размером получаемых НЧ может

осуществляться двумя основными путями: 1) скоростью нагрева реакционной смеси и 2) общей продолжительностью реакции. В отличие от данных подходов нами была продемонстрирована возможность контролируемого управления размерами КНЧМ с помощью подбора концентраций прекурсоров в реакционной смеси. Так, например, постепенное увеличение мольного соотношения FeOL к NaOL, который был использован в качестве ПАВ, привело к росту среднего размера КНЧМ (Рисунок 26).

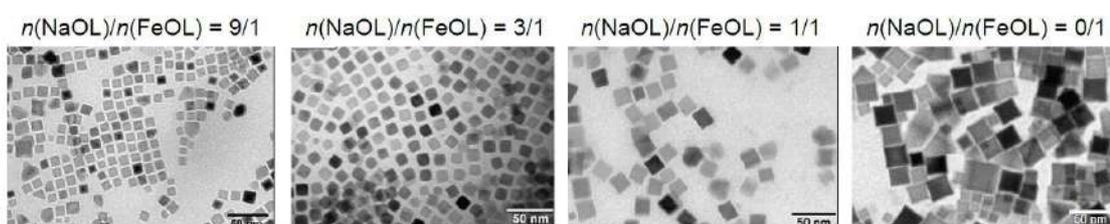


Рисунок 26 – ПЭМ-микрофотографии КНЧМ, полученных при различном мольном соотношении FeOL к NaOL (шкала: 50 нм)

Полученная зависимость среднего размера КНЧМ от мольного соотношения NaOL к FeOL имеет экспоненциальный характер и, таким образом, позволяет теоретически предсказать необходимое количество NaOL для получения КНЧМ с желаемым размером в диапазоне 10 – 30 нм (Рисунок 27).

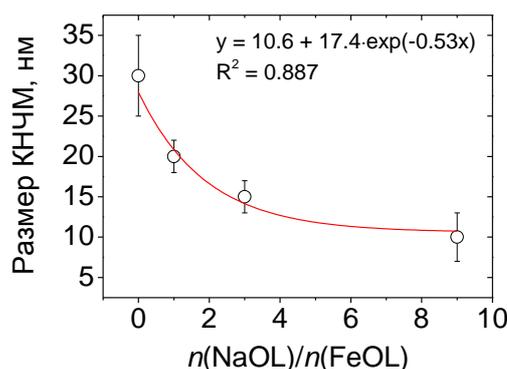


Рисунок 27 – Зависимость размера магнитного ядра КНЧМ (по длине ребра куба) от мольного соотношения NaOL/FeOL в реакционной смеси

Примечательно, что наибольшее влияние NaOL на средний размер образующихся КНЧМ прослеживается в диапазоне соотношений $0 < n(\text{NaOL})/n(\text{FeOL}) < 4$, тогда как в диапазоне $4 < n(\text{NaOL})/n(\text{FeOL}) < 9$ получаемые КНЧМ имеют практически одинаковый размер.

Вероятнее всего, такая закономерность обусловлена тем, что в диапазоне соотношений $4 < n(\text{NaOL})/n(\text{FeOL}) < 9$ в реакционной смеси присутствует большой избыток олеат-ионов, которые плотно адсорбируются на поверхности формирующихся НЧ, тем самым, осложняя диффузию ионов Fe из раствора к поверхности растущего кристалла. Однако, с уменьшением $n(\text{NaOL})/n(\text{FeOL})$ доступ ионов Fe к поверхности НЧ облегчается ввиду снижения плотности адсорбированного слоя олеат-ионов, что, в свою очередь, приводит к образованию КНЧМ большего размера. Таким образом, полученные результаты напрямую подтверждают ключевую роль ПАВ в процессах формирования и роста нанокристаллов.

КНЧМ были также синтезированы методом термического разложения $\text{Fe}(\text{асас})_3$ в дибензиловом эфире с добавлением олеиновой кислоты. В процессе протекания реакции $\text{Fe}(\text{асас})_3$ изначально реагирует с олеиновой кислотой с образованием промежуточного олеатного комплекса FeOL, который затем уже термически разлагается с образованием КНЧМ [118]. В ходе проведения экспериментов нами было показано, что скорость нагрева реакционной смеси ΔT , а также продолжительность τ ее выдержки по достижении температуры кипения, напрямую влияют на размер и полидисперсность (PDI) получаемых КНЧМ. Так, например, при $\Delta T = 15 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ КНЧМ имели PDI $\sim 0,35$, тогда как при $\Delta T = 3 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ PDI $\sim 0,13$ (Рисунок 28). Полученный результат можно объяснить тем, что при высоких ΔT процесс зародышеобразования НЧ протекает с более высокой скоростью и неравномерно, что обуславливает, в итоге, небольшой размер получаемых КНЧМ. Кроме того, повышение τ с 2 до 4 ч привело к образованию КНЧМ с большим средним размером ядра.

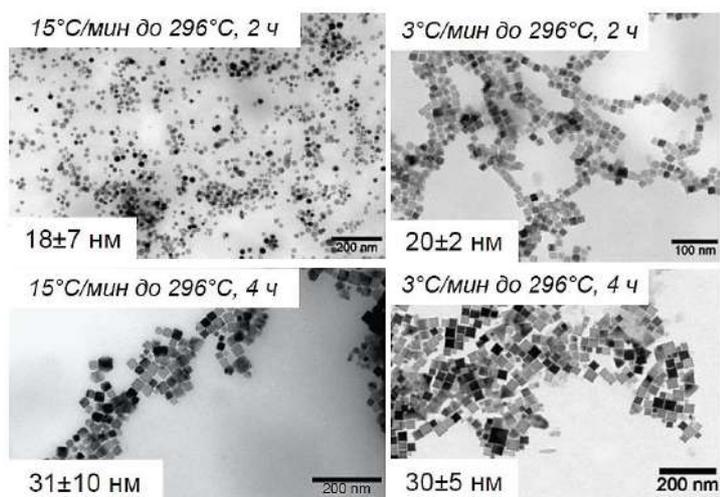
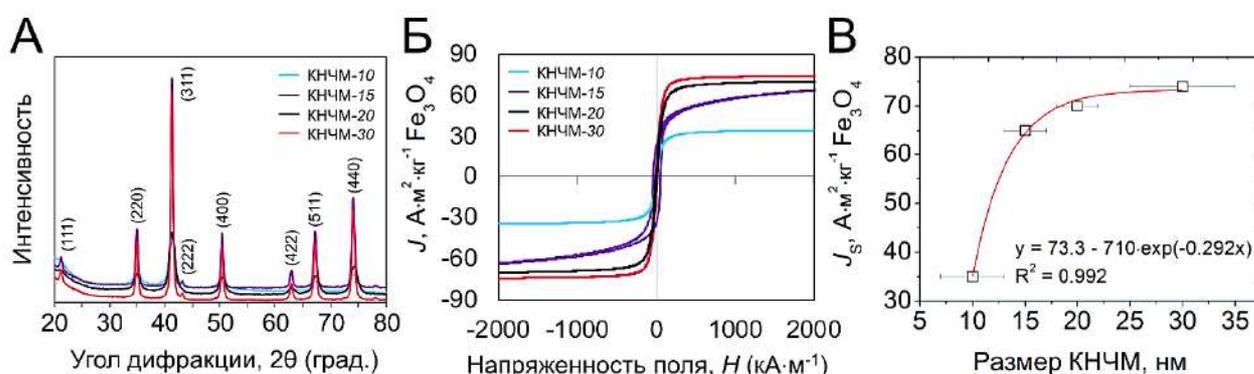


Рисунок 28 – ПЭМ-микрофотография КНЧМ, полученных термическим разложением $\text{Fe}(\text{асас})_3$ при различных скорости нагрева реакционной смеси и продолжительности синтеза при $296 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.2 Исследование структуры и магнитных свойств КНЧМ

На рентгенограммах порошков КНЧМ (Рисунок 29А), зарегистрированных методом РФА, можно наблюдать ряд рефлексов при 21.28° , 35.10° , 41.41° , 43.35° , 50.48° , 62.97° , 67.28° и 74.18° , положение и относительная интенсивность которых соответствуют плоскостям (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) и (440) кристалла магнетита. Кроме того, методом РФА было показано, что значение параметра решетки кристалла a для всех образцов КНЧМ соответствует аналогичному значению для чистого магнетита ($a = 0,8396$ нм, JCPDS №19-0629), в то время как сами КНЧМ являются монокристаллами, о чем свидетельствует корреляция данных о размере КНЧМ, полученных методами рентгеноструктурного анализа и ПЭМ (Таблица 2).



А – рентгенограммы порошков КНЧМ, Б – кривые намагничивания порошков КНЧМ при $T = 300$ К, В – зависимость удельной намагниченности насыщения J_S КНЧМ от их размера при $T = 300$ К.

Рисунок 29 – Анализ структуры и магнитных свойств КНЧМ

Таблица 2 – Основные физические характеристики образцов КНЧМ

Образец	Размер ядра по ПЭМ, нм	Размер кристаллита, нм	Удельная намагниченность насыщения J_S , $A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$	Остаточная намагниченность J_R , $A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$	Коррелятивная сила H_C , $kA \cdot m^{-1}$
КНЧМ-10	10 ± 3	9,462(6)	35	1,4	3,6
КНЧМ-15	15 ± 2	14,104(18)	65	1,3	1,2
КНЧМ-20	20 ± 2	20,20(12)	70	4,1	4,4
КНЧМ-30	30 ± 5	34,91(11)	74	5,0	4,6

На основании данных магнитометрии можно сделать вывод, что значение удельной намагниченности насыщения J_S КНЧМ возрастает по экспоненциальному закону с увеличением размера их магнитного ядра от $35 \text{ A}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$ для КНЧМ-10 до $74 \text{ A}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$ для КНЧМ-30 и стремится к значению J_S для объемного материала ($92 \text{ A}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ при $T = 300 \text{ K}$) (Рисунок 29В). При этом относительно невысокое значение J_S для КНЧМ-10, вероятнее всего, объясняется их частичным окислением. Кроме того, значения остаточной намагниченности J_R резко возросли для КНЧМ с размерами $>20 \text{ нм}$, что также хорошо согласуется с ранее установленным критическим размером зерен ($\sim 20 \text{ нм}$), ниже которого магнетит переходит в суперпарамагнитное состояние.

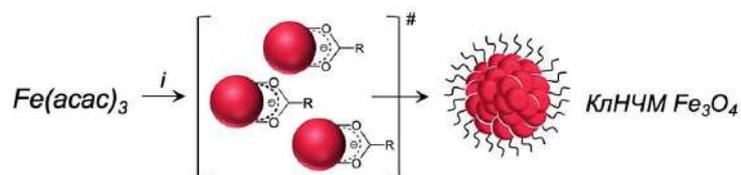
Для дополнительного доказательства образования фазы магнетита были зарегистрированы мёссбауэровские спектры порошков КНЧМ при комнатной температуре. На спектре каждого из образцов наблюдались два секстета, обусловленные различным вкладом ионов Fe^{3+} и Fe^{2+} , находящихся в октаэдрических и тетраэдрических подрешетках кристалла. В свою очередь, кристаллохимическая формула для Fe_3O_4 может быть записана в виде $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}_{1-3k}\text{Fe}^{3+}_{1+2k} \varphi_k]\text{O}_4$, где φ обозначает вакансию, а k обозначает параметр вакансии. В результате экспериментальные значения параметра вакансии k составили всего лишь несколько сотых долей (Таблица 3), что подтверждает факт того, что все синтезированные КНЧМ являются чистым магнетитом.

Таблица 3 – Значения основных параметров, рассчитанных из мёссбауэровских спектров

Образец	Область мессбауэровского спектра, занимаемая ионами Fe^{3+} в тетраэдрической позиции (S_a)	Область мессбауэровского спектра, занимаемая ионами Fe^{2+} в октаэдрической позиции (S_b)	S_b/S_a (σ)	Параметр вакансии (k)	Fe^{2+}/Fe , %
КНЧМ-10	40,8	59,2	1,45	0,042	29
КНЧМ-15	34,9	65,1	1,87	0,008	33
КНЧМ-20	35,6	64,4	1,81	0,013	32
КНЧМ-30	34,4	64,7	1,88	0,007	33

3.1.3 Разработка методики синтеза кластерных наночастиц магнетита (КЛНЧМ)

Синтез КЛНЧМ осуществлялся методом термического разложения $\text{Fe}(\text{acac})_3$ в дибензиловом эфире (Рисунок 30) с добавлением различных циклических алифатических и ароматических карбоновых кислот, причем, как в чистом виде, так и в смеси с олеиновой кислотой (Таблица 4).



Реагенты и условия: (i) 1,2-ГДД, циклические алифатические и ароматические карбоновые кислоты; дибензиловый эфир, Ar, 260 °С

Рисунок 30 – Схематическое изображение методики синтеза КЛНЧМ

Таблица 4 – Органические кислоты, использованные в процессе синтеза КЛНЧМ

Кислоты	Образцы	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Олеиновая															
Циклопропанкарбоновая															
Циклобутанкарбоновая															
Циклопентанкарбоновая															
Циклогексанкарбоновая															
Бензойная															
Бифенил-4-карбоновая															
1-Инданкарбоновая															

Образцы *K1*, *K3*, *K5*, *K7*, *K9*, *K11* и *K13* были получены с использованием смеси соответствующей циклической алифатической или ароматической карбоновой кислоты и олеиновой кислоты в одинаковых мольных соотношениях (см. раздел III). Было обнаружено, что природа органической кислоты влияет как на морфологию отдельных НЧ, так и на общую структуру получаемых КЛНЧМ. Так, с помощью ПЭМ было установлено, что образцы *K1*, *K2*, *K4*, *K6*, *K10*, *K11* и *K14* представляют собой кластерные наноструктуры с различной морфологией, а образцы *K3*, *K5*, *K7*, *K8*, *K9* и *K13* представляют собой ограненные сферы различного размера (Рисунок 31).

Вероятнее всего, в случае образцов *K1*, *K2*, *K4*, *K6*, *K10*, *K11* и *K14* образование нанокластеров происходит из предварительно сформированных в реакционной смеси отдельных НЧ. Доказательством данной гипотезы является наличие отдельных НЧ на ПЭМ-микрофотографиях полученных образцов, а также отчетливо различимое расстояние

между отдельными НЧ, из которых состоит нанокластер. В свою очередь, механизм формирования нанокластеров может быть хорошо описан процессами множественной адсорбции-десорбции органических кислот на поверхности изначально формирующихся в реакционной смеси НЧ. Количество десорбированной с поверхности НЧ кислоты будет тем выше, чем больше сродство у такой кислоты к растворителю – дибензиловому эфиру, имеющему константу липофильности $\log P = 3,95$. Среди всех используемых циклических карбоновых кислот, циклопропанкарбоновая кислота имеет самое низкое сродство к дибензиловому эфиру (Таблица 5). Для того, чтобы наиболее полно исследовать влияние адсорбции конкретной кислоты на процесс зародышеобразования и рост кристалла, были дополнительно проведены синтезы с использованием смеси органической кислоты и олеиновой кислоты, чтобы проверить, приведет ли частичное замещение органической кислоты олеиновой кислотой к идентичным наноструктурам. Примечательно, что в случае использования как чистой циклопропанкарбоновой кислоты, так и ее смеси с олеиновой кислотой, были получены сферические кластеры с одинаковой структурой и средним размером (образцы *K1* и *K2*). Скорее всего, первоначально зародыши МНЧ из оксида железа были стабилизированы обеими кислотами. Затем молекулы циклопропанкарбоновой кислоты могут сорбироваться на свободных участках поверхности МНЧ или же могут диффундировать на поверхность МНЧ, вытесняя молекулы олеиновой кислоты.

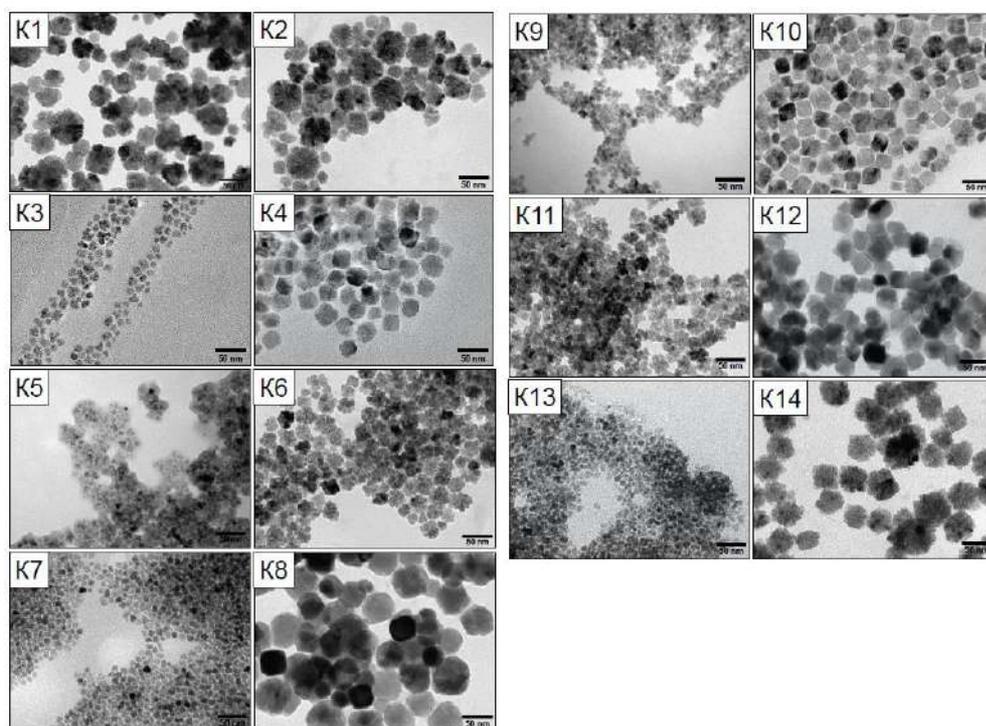


Рисунок 31 – ПЭМ-микротографии синтезированных наночастиц в соответствии с
Таблицей 4

Однако циклопропанкарбоновая кислота имеет самое низкое значение $\log P = 0,48$ среди всех алифатических циклических карбоновых кислот и, следовательно, она более прочно закрепляется на поверхности МНЧ, тогда как олеиновая кислота остается в растворе.

Таблица 5 – Основные физические характеристики кислот, использованных в синтезе КЛНЧМ

Кислоты	$\log P$	Температура кипения, °С
Циклопропанкарбоновая	0,48	182 – 184
Циклобутанкарбоновая	0,87	195
Циклопентанкарбоновая	1,26	216
Циклогексанкарбоновая	1,89	231 – 233
Бензойная	1,87	249
1-Инданкарбоновая	1,79	325
Бифенил-4-карбоновая	3,75	373
Олеиновая	6,78	360

Таким образом, природа кислот и значения $\log P$ влияют на размер и морфологию полученных МНЧ. При увеличении $\log P$ от циклопропанкарбоновой кислоты к циклогексанкарбоновой кислоте в присутствии олеиновой кислоты образование нанокластеров обнаружено не было. Значение $\log P$ для циклобутанкарбоновой кислоты составляет 0,87, что примерно в два раза больше, чем для циклопропанкарбоновой кислоты. Таким образом, молекулы циклобутанкарбоновой кислоты имеют большее сродство к растворителю. На ПЭМ-микрофотографиях (Рисунок 31) можно видеть, что в образце *K3* имеется множество индивидуальных МНЧ, не обладающих кластерной природой. Более того, размер кристаллитов в образце *K3* меньше в сравнении с образцом *K1*, что можно объяснить тем, что на поверхности МНЧ сорбируется все больше молекул олеиновой кислоты, что, в свою очередь, препятствует последующей адгезии индивидуальных МНЧ с образованием нанокластеров. Циклопентанкарбоновая и циклогексанкарбоновая кислоты имеют еще более высокие значения $\log P$ (~ в 2 и 3 раза, соответственно) в сравнении с циклопропанкарбоновой кислотой. Таким образом, данные кислоты обладают еще более низким сродством к МНЧ и легко замещаются олеиновой кислотой, в результате чего, диффузия ионов железа к поверхности растущих кристаллов затруднена, что приводит к образованию небольших некластеризованных наночастиц (образцы *K5* и *K7*). Наоборот, в случае использования чистой циклопропанкарбоновой кислоты (образец *K1*), кластерные наночастицы образуются из крупных МНЧ, в связи с тем, что такая кислота имеет небольшой размер молекул, которые не препятствует диффузии ионов железа к поверхности растущих наночастиц. Такое же

наблюдение справедливо для чистой циклобутанкарбоновой кислоты (образец *K4*). Циклопентанкарбоновая кислота (образец *K6*) имеет больший по размеру заместитель (“алифатический хвост”), что затрудняет диффузию ионов Fe, в результате чего кластеры имеют меньший размер кристаллитов. Циклогексанкарбоновая кислота, имеющая более высокое значение $\log P = 1,89$, легко десорбируется в раствор, вследствие чего поверхность наночастиц становится более доступной для ионов Fe. Таким образом, диффузия ионов Fe протекает легко, что приводит к образованию крупных наночастиц. Смесь бензойной и 1-индакарбоновой кислот с олеиновой кислотой приводит к результату, аналогичному вышеописанным примерам. Бифенил-4-карбоновая кислота имеет самое высокое значение $\log P = 3,75$ среди всех циклических карбоновых кислот. В случае чистой бифенил-4-карбоновой кислоты (образец *K12*) кластерная морфология не наблюдается из-за легкой десорбции такой кислоты в раствор.

Для подтверждения того, что 1,2-ГДД, использованный в реакциях получения КЛНЧМ, сам по себе не приводит к образованию кластерных наноструктур, был проведен синтез наночастиц только с добавлением в реакционную смесь 1,2-ГДД, олеиновой кислоты и дибензилового эфира. В результате были получены только наночастицы с формой усеченных сфер (Рисунок 32).

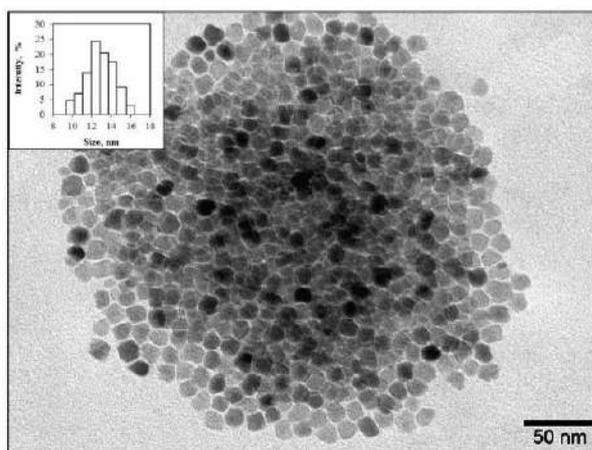


Рисунок 32 – ПЭМ-микротография НЧ, синтезированных в присутствии 1,2-ГДД и ОА

Также было установлено, что в ряду «циклопропан-, циклобутан-, циклопентанкарбоновая кислота» размер всей КЛНЧМ и отдельных кристаллитов, из которых состоит такой кластер, уменьшался по логарифмическому закону с увеличением константы липофильности кислоты (Рисунок 33). При этом каждое увеличение $\log P$ на 0,4 приводило к уменьшению размера как всего кластера, так и его отдельных кристаллитов в $\sim 1,3$ раза.

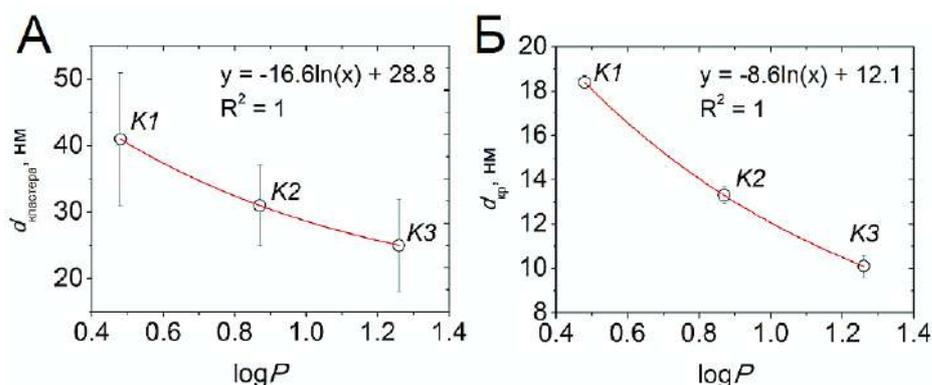


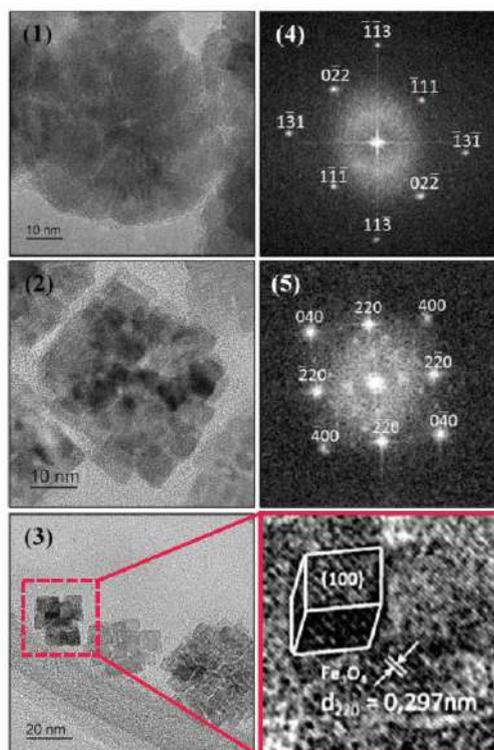
Рисунок 33 – Зависимость размеров (А) КлНЧМ и (Б) отдельных кристаллитов в составе КлНЧМ от константы липофильности циклических алифатических карбоновых кислот

Однако, размер наночастиц в образце *K8*, синтезированном в присутствии циклогексанкарбоновой кислоты ($\log P = 1,89$), не согласуется с полученными зависимостями, что, вероятнее всего, объясняется появлением дополнительных стерических факторов, обусловленных существованием различных конформаций циклогексана. По этой же причине не удалось также выявить однозначной зависимости размеров КлНЧМ от значений $\log P$ в ряду ароматических кислот.

3.1.4 Исследование структуры и магнитных свойств КлНЧМ

Более подробная информация о структуре КлНЧМ была получена с помощью ПЭМВР (Рисунок 34). Из полученных микрофотографий можно видеть, что отдельные КлНЧМ в образцах *K1* и *K14* случайно дезориентированы относительно направления первичного электронного пучка, но внутри состоят из достаточно совершенных монокристаллических частиц с одинаковой ориентацией (Рисунок 34 (1), (2)). Кроме того, из электронных дифрактограмм образцов КлНЧМ ясно видно, что ориентация отдельных частиц в каждом кластере очень близка (Рисунок 34 (4), (5)). Расстояние между двумя плоскостями в отдельных частицах в определенном направлении составляет 0,297 нм, что, скорее всего, является шагом решетки (220) плоскостей фазы Fe_3O_4 (Рисунок 34(6)). КлНЧМ-*K1* и *K14* отличаются по форме и плотности. Более того, на примере образца *K14* (Рисунок 34 (3)) можно видеть, что процесс роста кластера начинается с агрегации небольшого количества отдельно сформировавшихся зародышей наночастиц, что подтверждает факт того, что механизм образования кластеров связан с процессом самоорганизации отдельных МНЧ. Примечательно, что в конечных продуктах были также обнаружены индивидуальные МНЧ, что также является подтверждением

формирования КлНЧМ путем ориентированной агрегации отдельных МНЧ, а не путем сращивания отдельных МНЧ друг с другом (Рисунок 35).



1 – образец *K1*, 2 – образец *K14*, 3 – процесс формирования кластера *K14*, 4 – электронная дифрактограмма образца *K1*, 5 – электронная дифрактограмма образца *K14*

Рисунок 34 – ПЭМВР-микрофотографии КлНЧМ

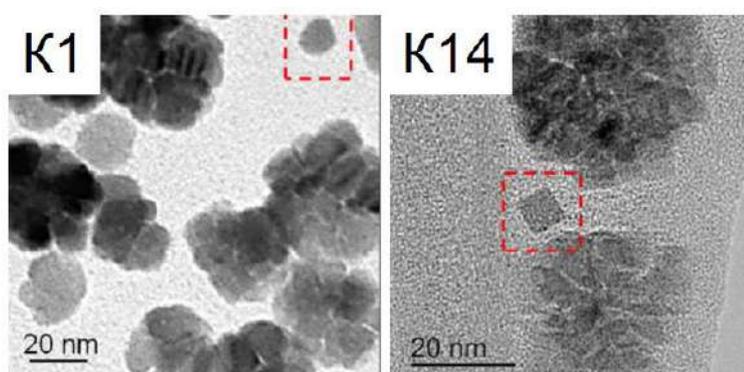


Рисунок 35 – ПЭМ-микрофотографии образцов *K1* и *K14*

Учитывая все вышесказанное, можно предположить, что использованные в реакциях кислоты могут находиться как на поверхности КлНЧМ, так и на поверхности отдельных МНЧ в

их дефектах. Чтобы подтвердить это предположение, были зарегистрированы инфракрасные спектры с Фурье-преобразованием всех полученных образцов (Рисунок 36).

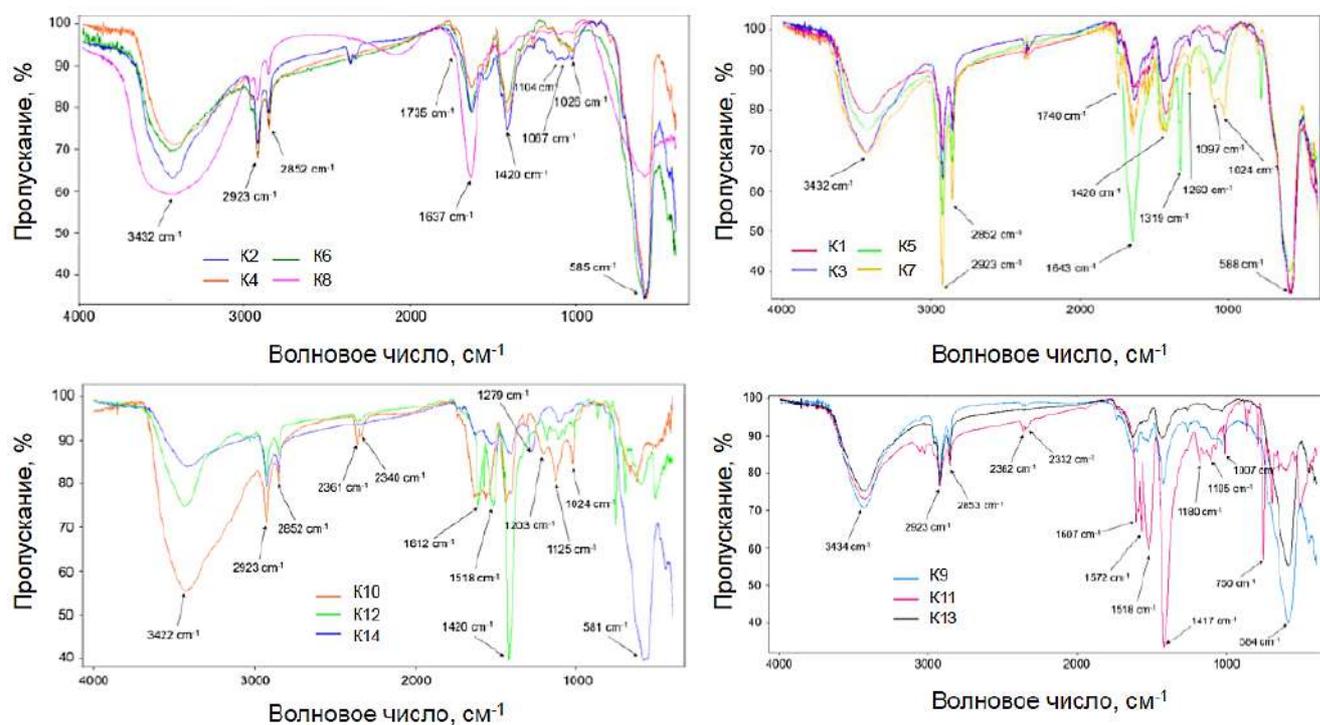


Рисунок 36 – ИК-спектры образцов *K1 – K14*

Пик при $581 - 588 \text{ см}^{-1}$ соответствует колебанию связей Fe – O и присутствует во всех зарегистрированных спектрах [140]. Пики при 1420 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям карбоксильных групп и также наблюдаются в каждом ИК-спектре образцов, синтезированных с добавлением циклических карбоновых кислот [63; 115]. В чистой олеиновой кислоте этот пик присутствует в форме дублета с одинаковыми интенсивностями (1413 см^{-1} и 1458 см^{-1}). Пики при 1635 см^{-1} и 3432 см^{-1} соответствуют колебаниям молекул воды, которые, вероятнее всего, присутствуют в КВг [49]. Пик при 1735 см^{-1} соответствует вибрациям карбонильной группы C=O. Сравнивая ИК-спектры наночастиц, синтезированных с использованием чистых алифатических циклических карбоновых кислот, с ИК-спектрами наночастиц, синтезированных в присутствии смеси таких кислот с олеиновой кислотой, можно увидеть увеличение интенсивности пика при 1097 см^{-1} в гомологическом ряду алифатических кислот, начиная с циклопропанкарбоновой кислоты. В случае чистой бензойной, бифенил-4-карбоновой и 1-инданкарбоновой кислот также можно наблюдать характерные полосы каждой кислоты. Например, в случае образца *K12* можно наблюдать характерные пики от 1000 см^{-1} до 1200 см^{-1} (два дублета и синглет), что хорошо согласуется с данными, полученными для чистой бифенил-

4-карбоновой кислоты (Рисунок 37). Следует отметить, что из-за большого количества пиков в спектрах циклических ароматических кислот трудно установить какие-либо очевидные изменения в спектрах образцов, синтезированных с добавлением олеиновой кислоты и без нее.

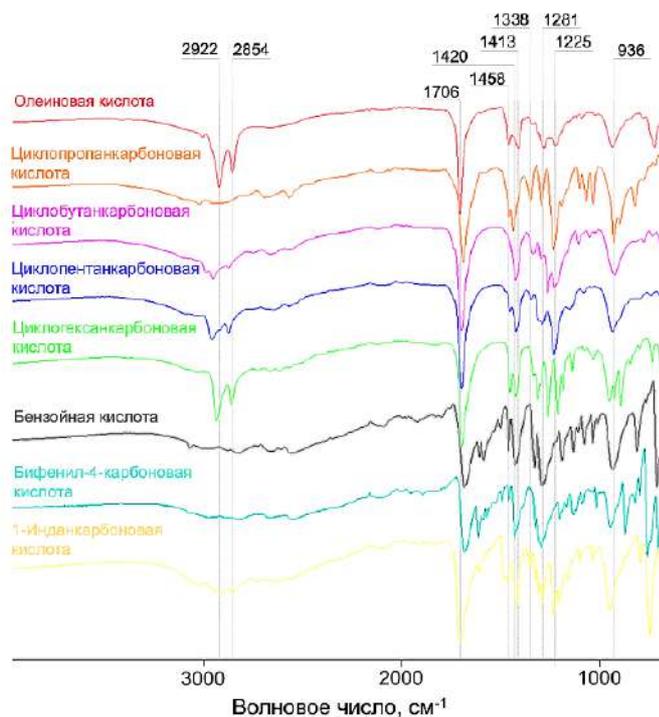


Рисунок 37 – ИК-спектры чистых кислот

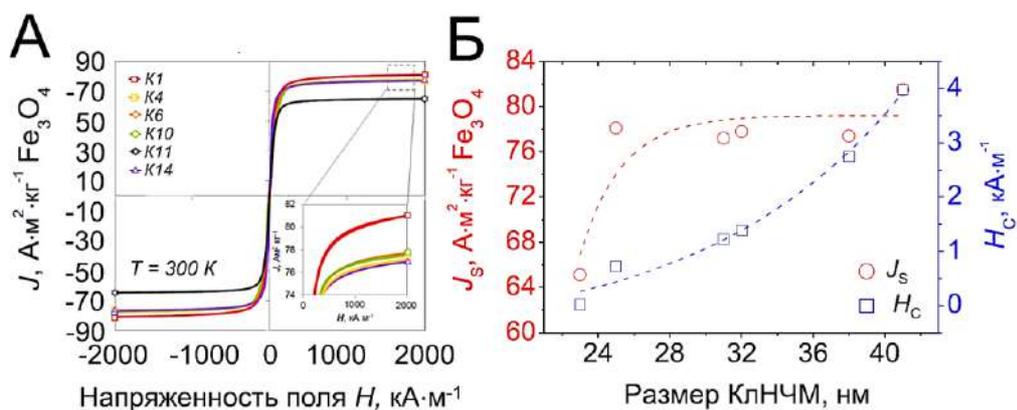
Сопоставление данных о размере КлНЧМ, полученных методами рентгеноструктурного анализа и ПЭМ, свидетельствует о том, что синтезированные образцы являются поликристаллическими структурами. Методом РФА было установлено, что КлНЧМ являются чистым магнетитом (Таблица 6).

Таблица 6 – Основные структурные и магнитные свойства КлНЧМ

Образец	Размер по ПЭМ (диагональ), нм	Размер кристаллит а, нм	Параметр решетки наночастиц, нм	Удельная намагниченность насыщения J_s , $A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$	Остаточная намагниченность, J_R , $A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$
K1	41±10	18,4(3)	0,8392(6)	81,5	4,2
K4	31±6	13,3(4)	0,8387(3)	77,2	1,4
K6	25±7	10,1(5)	0,8384(12)	78,1	0,9
K10	32±4	15,9(3)	0,8407(18)	77,8	1,6
K11	23±6	12,7(2)	0,8390(9)	65,1	2,1
K14	38±8	10,8(5)	0,8399(10)	77,4	4,5

Исследования магнитных свойств образцов КлНЧМ выявили высокие значения J_s , присущие массивному материалу (Рисунок 38, Таблица 6). Данное явление может быть

объяснено магнитостатическими взаимодействиями между отдельными наночастицами в составе кластера, в результате которых происходит упорядочивание их магнитных моментов, приводящее к повышенным значениям J_S по принципу суперпозиции [20]. Следовательно, наночастицы в суперпарамагнитном состоянии приобретают магнитоупорядоченное состояние, которое увеличивает намагниченность насыщения. Так, например, для образца *K14* со средним размером кубического кластера 38 нм, состоящего из отдельных кубических наночастиц со средним размером 11 нм, было получено значение $J_S = 77,4 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$, тогда как аналогичное значение для 10 нм кубических МНЧ оксида железа, описанное ранее в литературе не превышает $50 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ [1]. Сравнение полученных значения J_S для КлНЧМ с имеющимися аналогами в литературе позволяет говорить о том, что полученные образцы обладают одними из самых высоких значений удельной намагниченности насыщения, которая ранее была описана для наночастиц подобной морфологии. Так, Lee с соавторами [70] показали, что для 32 нм кластерных МНЧ магнетита, полученных полиольным методом, значения коэрцитивности и удельной намагниченности насыщения составляли 0,57 Э и $60,4 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$, соответственно. В нашем случае КлНЧМ-*K10* со средним размером 32 нм имели значения коэрцитивности и удельной намагниченности насыщения 17,5 Э и $77,8 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$, соответственно. Более того, наибольшее значение J_S ($80,4 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$) было получено авторами для кластеров с диаметром 422 нм, тогда как в нашей работе аналогичное значение J_S было намагниченность для КлНЧМ с размером 40 нм (образец *K1*). Значения J_S для образцов КлНЧМ-*K4* и *K10*, оказались практически идентичны значению J_S , полученному для КНЧМ-30, что еще раз подтверждает наличие магнитостатических взаимодействием между отдельными нанокристаллами, образующих кластер.



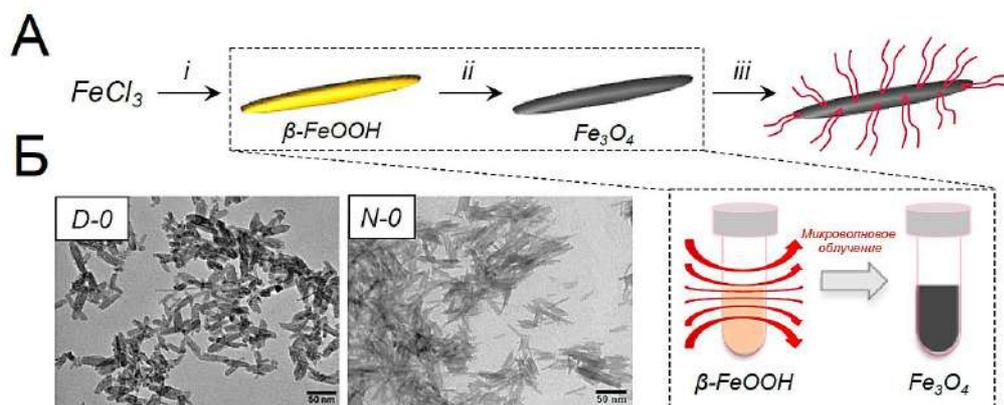
А – кривые намагничивания порошков КлНЧМ при $T = 300 \text{ К}$, Б – зависимость удельной намагниченности насыщения J_S и коэрцитивной силы H_C КлНЧМ от размера их магнитного ядра

Рисунок 38 – Магнитные свойства образцов КлНЧМ

Аналогично КНЧМ, значения J_s КлНЧМ экспоненциально возрастали с увеличением размера кластера от $65,1 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$ до $\sim 78 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$ (Рисунок 38Б). При этом значения коэрцитивной силы также возрастали экспоненциально с ростом размера КлНЧМ, тогда как для КлНЧМ с размерами $< 24 \text{ нм}$ $H_c \rightarrow 0$, что согласуется с критическим размером перехода магнетита в суперпарамагнитное состояние [70].

3.1.5 Разработка методики синтеза стержневидных наночастиц магнетита (СНЧМ)

Стержневидные форма является еще одним ярким представителем анизотропных МНЧ. Изменяя аспектное соотношение магнитного стержня, можно контролируемо управлять намагниченностью насыщения, коэрцитивностью и скоростью r_2 -релаксации. Для получения СНЧМ была разработана оригинальная двухстадийная методика синтеза (Рисунок 39). Так, было установлено, что первичные амины, в том числе высокомолекулярные, приводят к образованию стержневидной формы НЧ за счет специфической адсорбции на различных гранях растущих нанокристаллов. На первом этапе высокотемпературным гидролизом FeCl_3 в присутствии ПАВ (ДОФА или разветвленного высокомолекулярного ПЭИ ($M_w \sim 25\text{кДа}$)) были синтезированы прекурсоры – НЧ акагенита ($\beta\text{-FeOOH}$), не обладающие магнитными свойствами (Рисунок 39Б). При этом было установлено, что тип ПАВ напрямую влияет на аспектное соотношение получаемых НЧ. Использование DOPA привело к образованию крупных НЧ $\beta\text{-FeOOH}$ ($D-0$) с длиной $L = 40 \text{ нм}$ и диаметром $d = 10 \text{ нм}$ (аспектное соотношение 4:1), тогда как в присутствии ПЭИ были получены НЧ ($N-0$) с $L = 21 \text{ нм}$ и $d = 4 \text{ нм}$ и аспектным соотношением 5,3:1 (Рисунок 39Б). Полученный результат, вероятнее всего, обусловлен тем фактом, что молекулы полимера ПЭИ значительно превышают по размеру молекулы ДОФА, тем самым они в большей степени блокируют грани растущих НЧ, осложняя диффузию ионов Fe из раствора к поверхности растущего кристалла, приводя в итоге к НЧ меньшего размера. Данный факт также подтверждается тем, что при снижении концентрации ПЭИ размер и аспектное соотношение наностержней возрастают [59].



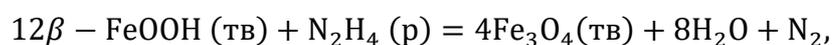
А – схематическое изображение методики синтеза и модификации СНЧМ,

Б – ПЭМ-микрофотографии синтезированных СНЧМ

Реагенты и условия: (i) ДОФА (D-0) или ПЭИ (N-0), 80 °С, 2 ч, (ii) $N_2H_4 \cdot H_2O$ (50 – 60%), NaOH, 100 °С, (iii) 1) ОА, УЗ-обработка, 2) $n-C_6H_{14}/H_2O$, Pluronic F-127, Ar, 25 °С, 24 ч

Рисунок 39 – Синтез, функционализация и исследование СНЧМ

На втором этапе необходимо было провести восстановление акагениита до магнетита без потери стержневидной формы изначальных прекурсоров. Стоит отметить, что большинство методик, в том числе проведение реакций при повышенной температуре с $NaBH_4$ или OAm в качестве восстановителей, приводили к потере стержневидной формы НЧ и образованию немагнитной фазы. В конечном итоге, был найден подходящий для этих целей метод микроволнового синтеза. Микроволновые химические реакции в настоящее время являются общепринятой практикой для получения НЧ и различных органических веществ [39; 78]. Однако микроволновый синтез НЧ требует подбора определенных параметров, что является трудоемкой задачей. Схема синтеза позволяет изменять различные реакционные параметры, такие как, например, количество циклов микроволнового облучения и концентрация восстановителя в конечном растворе, чтобы получить СНЧМ с желаемым размером и аспектным соотношением (Таблица 7, Рисунок 40). По своей сути реактор представлял собой автоклав – герметичную ампулу, которую затем подвергали различному количеству циклов микроволнового облучения (каждый цикл включал нагревание раствора до 100 °С, выдерживание в течение 30 с при данной температуре и охлаждение до 35 °С). В качестве восстановителя использовали гидрат гидразина $N_2H_4 \cdot H_2O$. Протекающая при этом реакция восстановления акагениита до магнетита может быть представлена следующим образом:



а механизм реакции может быть описан следующей цепочкой уравнений:

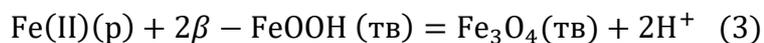
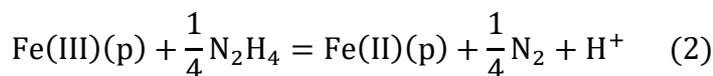
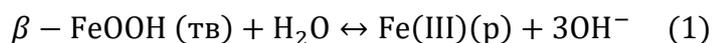


Таблица 7 – Основные параметры синтеза при восстановлении прекурсоров *D-0* и *N-0* до магнетита в реакции микроволнового синтеза

Образец	Концентрация $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в конечном растворе, моль/л	Количество циклов восстановления	Средний размер наночастиц, нм	
			Длина, L	Диаметр, d
<i>D-0 (N-0)</i>	0	0	40 (21)	10 (4)
<i>D-1 (N-1)</i>	0,052	3	40 (21)	10 (4)
<i>D-2 (N-2)</i>	0,103	3	42 (22)	15 (4)
<i>D-3 (N-3)</i>	0,503	3	86 (35)	

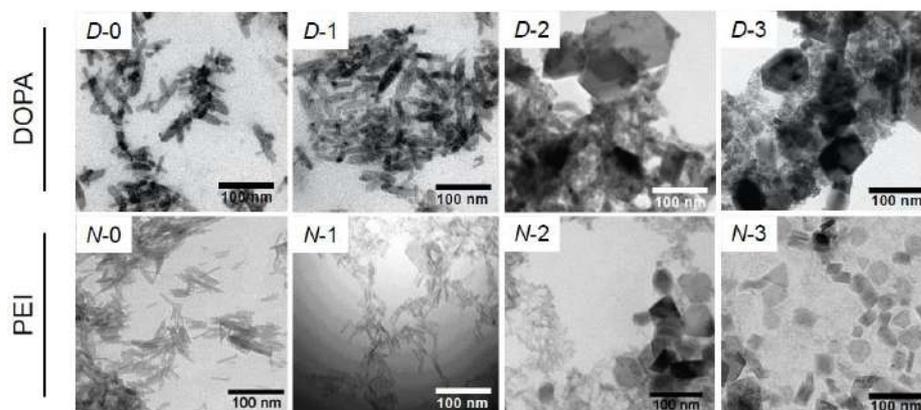


Рисунок 40 – ПЭМ-микрофотографии прекурсоров (*D-0* и *N-0*) и образцов НЧ, полученных после их восстановления

Один цикл облучения во всем диапазоне исследованных концентраций $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ привел к образованию немагнитных наночастиц. Два цикла облучения в присутствии 0,052М $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ позволили частично восстановить прекурсор, однако, РФА показал присутствие в образце немагнитных примесей гётита ($\alpha\text{-FeOOH}$) и $\beta\text{-FeOOH}$. Дальнейшее увеличение концентрации $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ повлекло за собой потерю стержневидной формы наночастиц (Рисунок 41).

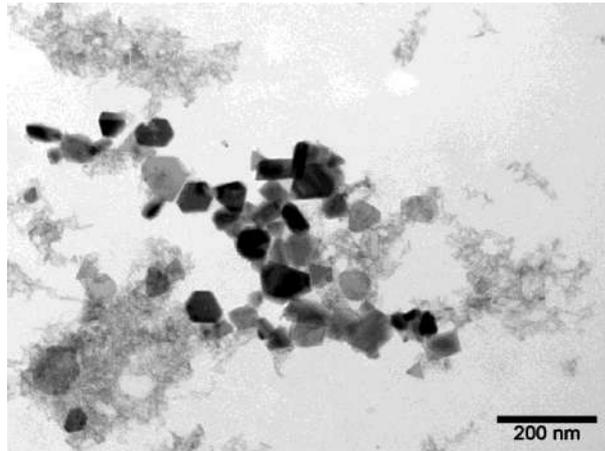


Рисунок 41 – ПЭМ-микрофотография НЧ, полученных после двух циклов облучения в присутствии 0,103М $N_2H_4 \cdot H_2O$

В случае 3-х циклов облучения 0,052М $N_2H_4 \cdot H_2O$ оказалось достаточно для полного восстановления прекурсора без потери его формы. Более высокие концентрации восстановителя привели к образованию НЧ полиморфной формы (*N-2* и *N-3*). Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае восстановления прекурсора *D-0*. Таким образом, нам удалось сохранить аспектное соотношение СНЧМ (5,25) в сравнении с другими работами [59; 125], в которых прекурсор терял стержневидную форму после восстановления.

3.1.6 Исследование структуры и магнитных свойств СНЧМ

Методом РФА было показано, что положение и относительная интенсивность дифракционных пиков для прекурсоров *N-0* и *D-0* соответствует чистому β -FeOОН ($a = 10,535 \text{ \AA}$, $c = 3,030 \text{ \AA}$, ICDD 34–1266) (Рисунок 42).

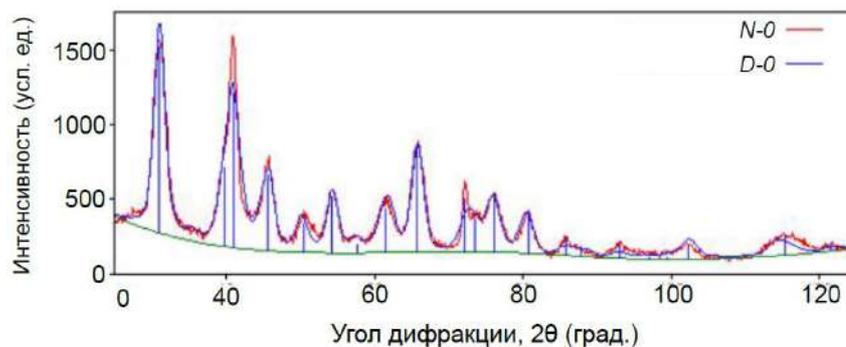


Рисунок 42 – Рентгенограммы образцов СНЧМ *N-0* и *D-0*

После восстановления прекурсоров, на рентгенограммах наблюдались новые рефлексы, которые могут быть отнесены к фазе магнетита Fe_3O_4 ($a = 8,396 \text{ \AA}$, ICDD №19–0629) или маггемита $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($a = 8,346 \text{ \AA}$, ICDD №39–1346) (Рисунок 43).

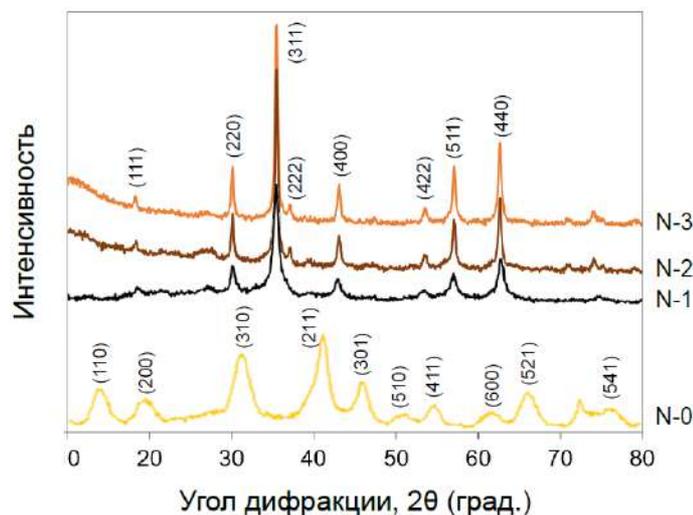


Рисунок 43 – Рентгенограммы образцов СЧМ

Из полученных кривых намагничивания (Рисунок 44) можно видеть, что значение удельной намагниченности насыщения J_s образца СЧМ *N-1* превышает аналогичное значение для образца СЧМ *D-1*, что вероятнее всего объясняется присутствием в нем примесей дополнительных немагнитных фаз, не обнаруженных РФА. Однако оба образца показали достаточно высокие значения коэрцитивной силы (Таблица 8), что не является желательным с точки зрения применения таких НЧ в МРТ-диагностике.

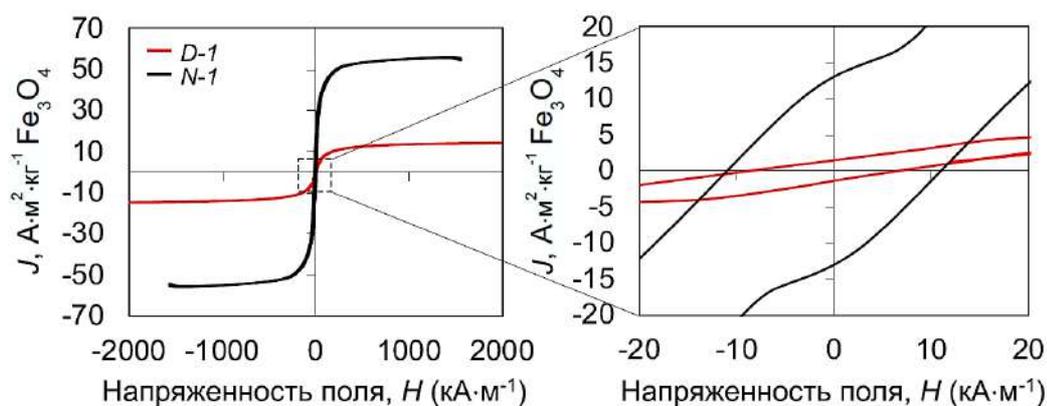


Рисунок 44 – Кривые намагничивания порошков СЧМ *D-1* и *N-1* ($T = 300 \text{ K}$)

Таблица 8 – Основные магнитные характеристики СНЧМ *D-1* и *N-1*

Образец	J_S , $A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$	J_R , $A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$	Коэрцитивная сила H_C , $kA \cdot m^{-1}$
<i>D-1</i>	14,1	1,5	7,9
<i>N-1</i>	54,4	14	11,2

В отличие от работы Mohapatra J. и соавторов [59], где $J_S = 50 A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$ было получено для СНЧМ с длиной 30 нм, мы наблюдали аналогичное значение ($54,4 A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$) для СНЧМ с длиной 21 нм (*N-1*). Кроме того, авторы отметили суперпарамагнитное поведение полученных СНЧМ с длинами в диапазоне 30 – 70 нм, что противоречит результатам, полученным для образца *N-1*, коэрцитивность которого составляет $11,2 \cdot m^{-1}$ кА. Однако данные магнитометрии для СНЧМ *N-1* коррелируют с более ранними работами [119], в которых значение $J_S = 58 A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$ было получено для наностержней γ -Fe₂O₃ с длиной $30,0 \pm 9,7$ нм и диаметром $5,7 \pm 1,8$ нм (аспектное соотношение 5,26).

3.2 Функционализации НЧ сополимерами Pluronic

Так как синтез КНЧМ и КлНЧМ проводился в неполярных средах с добавлением жирных кислот и их производных в качестве ПАВ, такие наночастицы обладали агрегативной устойчивостью только в неполярных органических растворителях, таких как н-гексан, толуол. Для проведения последующих *in vitro* и *in vivo* исследований была проведена дополнительная функционализация поверхности НЧ с целью их стабилизации в физиологических средах. Для решения данной задачи гидрофобные наночастицы были функционализированы клинически одобренными блок-сополимерами Pluronic® (F-127 и F-68) (НЧ@Pluronic) путем реализации механизма гидрофобных взаимодействий полиоксипропиленовых групп, входящих в состав сополимеров, и остатков ОА на поверхности НЧ. Данные сополимеры отличаются друг от друга содержанием гидрофильных (*x*) и гидрофобных звеньев (*y*) в их структуре (*x*:*y* = 4 для F-68 и *x*:*y* = 2,3 для F-127). Функционализация НЧ сополимерами проводилась в двухфазной системе (н-гексан – вода), что позволило избежать агрегации НЧ (Рисунок 45).

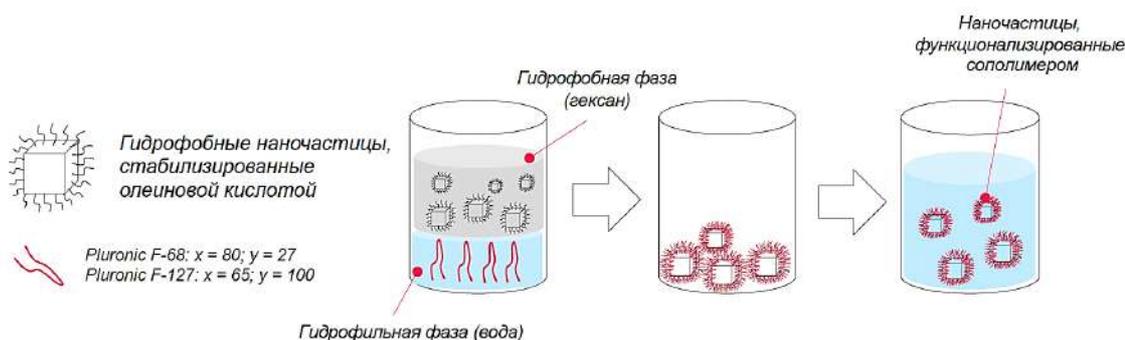


Рисунок 45 – Схематическое изображение процесса получения конъюгатов НЧ@Pluronic

При этом, во время проведения процедуры функционализации органический растворитель может быть также удален из реакционной смеси путем выпаривания при пониженном давлении или путем одновременного нагревания раствора и барботирования инертным газом – аргоном. Такой шаг приводит к ускорению процесса функционализации, однако, влечет за собой неизбежную частичную агрегацию НЧ.

Анализ агрегативной стабильности НЧ@Pluronic в фосфатно-солевом буфере (PBS) методом ДСР показал, что Pluronic F-127 является наиболее предпочтительным с точки зрения дальнейшего применения полученных наноконъюгатов в *in vivo* МРТ-диагностике. В этом случае НЧ находились в растворе в виде отрицательно заряженных мицелл с гидродинамическим размером $D_{гд} \sim 100$ нм (Рисунок 46).

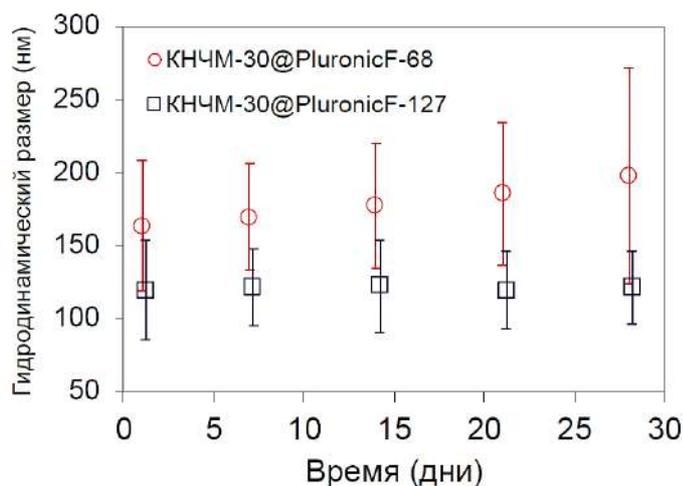


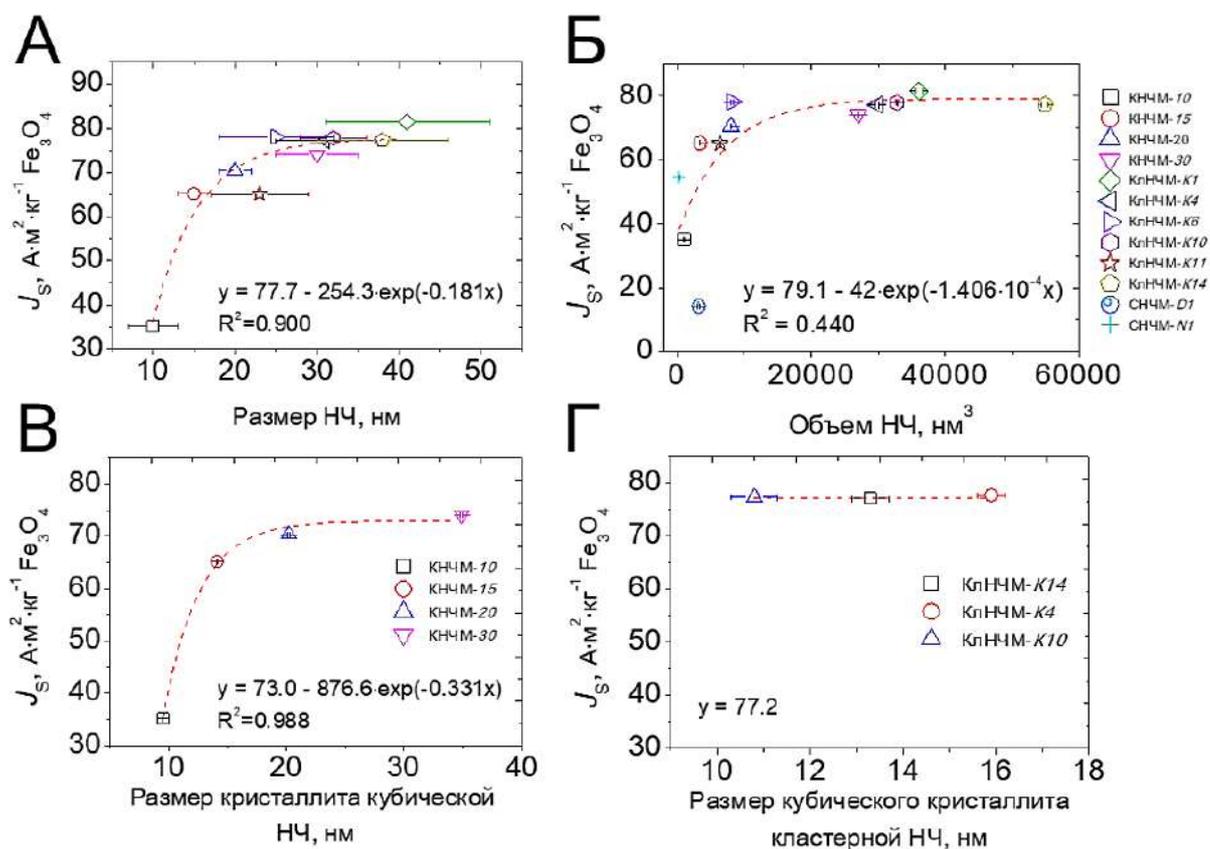
Рисунок 46 – Зависимость гидродинамического размера наноконъюгатов КНЧМ-30 с Pluronic от продолжительности инкубации в водном растворе PBS

Подобные мицеллярные структуры могут быть эффективно использованы в *in vivo* МРТ-экспериментах, в которых накопление КА при их внутривенном введении, основано на EPR-эффекте. НЧ, функционализированные Pluronic F-68, не обладали достаточной агрегативной стабильностью, тогда как их значения $D_{ГД}$ достигали 200 нм. Такие высокие значения гидродинамического размера не позволяют использовать полученные конъюгаты НЧ для внутривенного введения ввиду высокого риска образования тромбов в сосудах.

3.3 Сравнительный анализ магнитных свойств полученных НЧ

На заключительном этапе, объединив все полученные результаты, был проведен сравнительный анализ того, как изменяются магнитные свойства НЧ в зависимости от размеров их магнитных ядер и размеров отдельных кристаллитов. Было установлено, что с увеличением среднего размера НЧ, значения удельной намагниченности насыщения J_S также возрастают, практически достигая предсказанных значений J_S для объемного материала ($J_S(\text{Fe}_3\text{O}_4) = 92 \text{ А} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$ при $T = 300 \text{ К}$) уже при 40 нм (Рисунок 47А). При этом, зависимость J_S от размера НЧ в диапазоне 10 – 40 нм лучше всего описывается экспоненциальным законом, что хорошо согласуется с некоторыми ранее опубликованными работами [56; 60; 106]. Для всех типов НЧ, включая СНЧМ, также была обнаружена экспоненциальная зависимость J_S от объема V магнитного ядра НЧ (Рисунок 47Б).

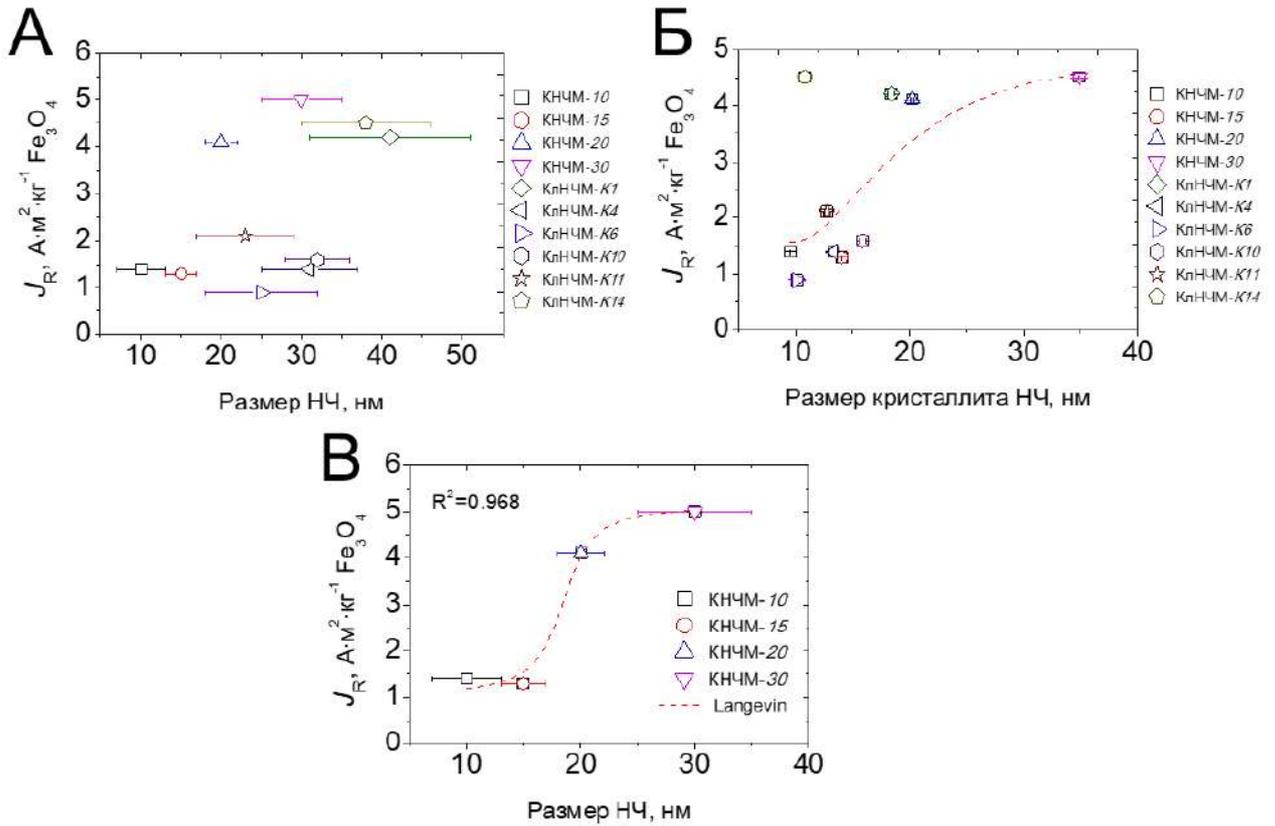
Принимая во внимание, что полученные КНЧМ являются монокристаллами, можно видеть, что изменение значений J_S для КНЧМ в зависимости от размеров их кристаллитов также хорошо описывается экспоненциальной функцией (Рисунок 47В). Однако, в то же самое время, в случае поликристаллических образцов кубических КЛНЧМ-К4, К10 и К14, имеющих практически одинаковый размер магнитного кластера (31 – 38 нм), увеличение размера их отдельных кристаллитов никак не влияет на значения J_S ($\sim 77 \text{ А} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$ при $T = 300 \text{ К}$) для всего кластера (Рисунок 47Г). В результате упорядочивания отдельных кубических кристаллитов в кластере, наблюдается явление магнитостатического эффекта, обуславливающего поведение такого кластера как монокристаллической частицы. Это также подтверждается и тем фактом, что полученные значения J_S для КНЧМ, имеющих размер аналогичный размеру кубических кристаллитов КЛНЧМ-К4, К10 и К14, оказались $< 77 \text{ А} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$. Таким образом, несмотря на явные различия в морфологии полученных НЧ, значения J_S могут быть хорошо описаны определенной функциональной зависимостью.



А – зависимость значений J_S НЧ от размера их магнитного ядра, Б – зависимость значений J_S от объема НЧ, В-Г – Зависимость значений J_S КНЧМ и 31 – 38 нм кубических КЛНЧМ от размеров их кристаллитов

Рисунок 47 – Сравнительный анализ статических магнитных свойств синтезированных НЧ

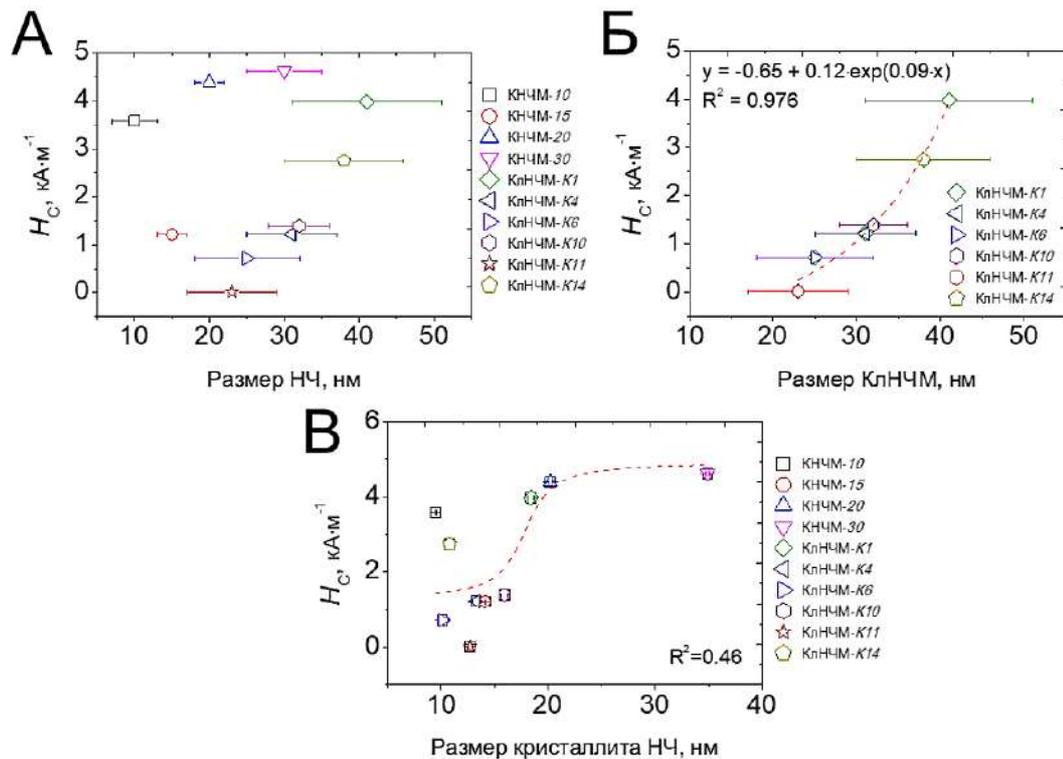
В случае остаточной намагниченности J_R не удалось выявить однозначной зависимости ее значений от размеров магнитных ядер для всех типов НЧ (Рисунок 48А), что, вероятнее всего, связано с явлением магнитостатического эффекта для КЛНЧМ. Однако при исследовании зависимости J_R от размеров отдельных кристаллитов НЧ, была выявлена логарифмическая закономерность (Рисунок 48Б), тогда как значения J_R резко возрастали для НЧ с размерами >20 нм, что хорошо согласуется с ранее установленным критическим размером зерен (~ 20 нм), ниже которого магнетит переходит в суперпарамагнитное состояние. В частности, это хорошо прослеживается на примере КНЧМ, для которых зависимость J_R от размера ядра НЧ лучше всего описывается функцией Ланжевена (Рисунок 48В).



А – от размера магнитного ядра НЧ, Б – от размера кристаллита, В – зависимость значений J_R КНЧМ от их размера

Рисунок 48 – Зависимость значений остаточной намагниченности J_R от различных параметров МНЧ

В виду ярко выраженных различий в морфологии НЧ, также не прослеживалось однозначной зависимости значений H_C от размера ядра НЧ (Рисунок 49А). Однако, в случае КлНЧМ, значения H_C возрастали экспоненциально с ростом размера КлНЧМ, тогда как для КлНЧМ с размерами <24 нм $H_C \rightarrow 0$, что согласуется с критическим размером перехода магнетита в суперпарамагнитное состояние (Рисунок 49Б). В свою очередь, можно видеть, что значения H_C изменяются в зависимости от размера кристаллита НЧ по экспоненциальному закону, тогда как максимум H_C достигается для монокристаллических КНЧМ-30 (Рисунок 49В).



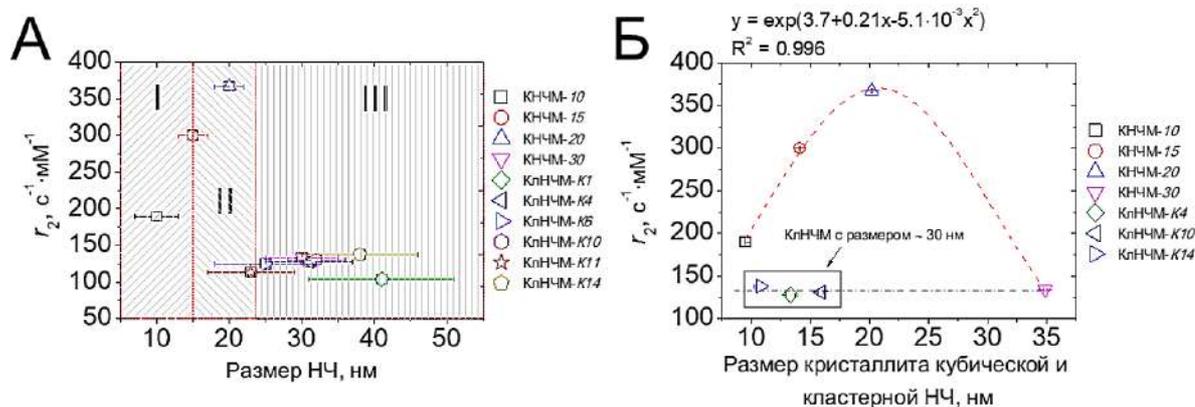
А – от размера магнитного ядра НЧ, Б – от размера отдельных кристаллитов, В – зависимость значений H_C КлНЧМ от их размера

Рисунок 49 – Зависимость коэрцитивной силы H_C от различных параметров МНЧ

Распределение скоростей r_2 -релаксации протонов воды в коллоидных растворах в зависимости от размера и объема НЧ имеет экстремум в области 20 нм (Рисунок 50А), что хорошо согласуется с ранее описанными в литературе тремя режимами определения r_2 [62; 65; 113]. На основании полученных данных можно сделать вывод, что при размере НЧ <15 нм преобладает «режим усреднения по размеру», в котором значения r_2 определяются в основном диффузионными движениями молекул воды во вторичной сфере. В области размеров 15 – 20 нм наблюдается «режим статической дефазировки», при котором значение флуктуирующее магнитное поле практически не усиливается, а значения r_2 независимо от $D_{Гд}$. В области размеров >20 нм наблюдается «режим замедленного движения», в котором увеличение размеров НЧ отрицательно сказывается на значениях r_2 для НЧ, занимающих пространство во вторичной сфере. Примечательно, что распределение скоростей r_2 -релаксации в присутствии

КНЧМ@Pluronic F-127 имело одномодальный характер с максимумом для 20 нм КНЧМ ($367 \text{ c}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$), тогда как для КНЧМ с размером >20 нм значения r_2 постепенно снижались. Так, для 30 нм КНЧМ-30 значение r_2 уже не отличалось от аналогичных значений для 31 – 38 нм

КлНЧМ-К2, К4 и К6. Несмотря на то, что КлНЧМ были составлены из одиночных кристаллитов, имеющих размеры, схожие с размерами КНЧМ, значения r_2 существенно не изменялись и, главным образом, зависели от размера всего кластера, что также является следствием магнитостатического эффекта и говорит о поведении кластера как единой монокристаллической частицы (Рисунок 50Б).



А – зависимость значений скорости r_2 -релаксации протонов воды от размера магнитного ядра НЧ, Б – зависимость значений скорости r_2 -релаксации протонов воды от размера отдельных кристаллитов КНЧМ и кубических КлНЧМ

Рисунок 50 – Сравнительный анализ динамических магнитных свойств НЧ@Pluronic F-127

Более низкие значения скорости r_2 -релаксации для водных коллоидов синтезированных КлНЧМ в сравнении с ранее полученными аналогичными значениями для других кластерных наночастиц может быть объяснено толщиной полимерной оболочки (Таблица 9). Ранее было показано, что увеличение размера полимерной оболочки приводит к уменьшению значений r_2 [22]. Pluronic F-127 имеет разветвленную структуру и большую молекулярную массу (12,5 кДа), что, скорее всего, затрудняет диффузию молекул воды и приводит к снижению значений r_2 . Тем не менее, полученные значения скорости r_2 -релаксации КлНЧМ сопоставимы со значениями r_2 для коммерческих контрастных веществ на основе наночастиц оксида железа [141].

Таблица 9 – Динамические магнитные свойства кластерных МНЧ

Образцы кластерных наночастиц	Размер, нм	Функциональное покрытие	r_2 , с ⁻¹ ·мм ⁻¹
Оксид железа [74]	13 36	Полиакриловая кислота	240 540
Оксид железа [83]	50	Полидофамин	160.68
Маггемит γ -Fe ₂ O ₃ [4]	127	Сополимер политриметиламмоний этилакрилата и полиакриламида	91
Магнетит Fe ₃ O ₄ [143]	58	Олеиновая кислота-олеиламин	117
Сложный оксид железа γ -Fe ₂ O ₃ /Fe ₃ O ₄ [23]	68	Додецилсульфат натрия	270
Магнетит Fe ₃ O ₄ [80]	73	Диблок-сополимер молочной и гликолевой кислот и полиэтиленгликоля	333
КлНЧМ K1 (Fe ₃ O ₄)	41	Pluronic F-127	104
КлНЧМ K14 (Fe ₃ O ₄)	38	Pluronic F-127	168

Чувствительность T2-КА, выраженная поперечной релаксивностью R_2 , зависит от длины диффузии молекул воды. Так, теория «внешней сферы» описывает возможные затруднения диффузии молекул воды вблизи магнитного ядра наночастицы в зависимости от ее размера и типа функционального покрытия. Как правило, увеличения значений r_2 протонов, добиваются намеренным индуцированием кластеризации НЧ [112]. В этом случае r_2 определяется тремя различными режимами: 1) «режим усреднения по размеру» (MAR), 2) «режим статической дефазировки» (SDR) и 3) «режим замедленного движения» (SMR). Для отдельных НЧ или небольших кластеров НЧ количество молекул воды во вторичной сфере невелико из-за их небольшого гидродинамического размера. В этом случае доминирует MAR режим, и общее значение r_2 определяется в основном диффузионными движениями молекул воды. По мере увеличения гидродинамического размера наночастиц площадь, подверженная неоднородностям магнитного поля, увеличивается, а эффективное удерживание молекул воды нарастает, что способствует увеличению значений r_2 . При увеличении размера наночастиц или размера кластеризации сверх определенного критического значения в режиме SDR не будет дальнейшего усиления флуктуирующего магнитного поля, а общее значение r_2 станет независимым от гидродинамического размера наночастиц. Дальнейшее увеличение размеров наночастиц приведет к режиму SMR, где увеличение размера наночастиц отрицательно повлияет на r_2 для наночастиц, занимающих пространство во вторичной сфере.

Это хорошо согласуется с тем, что в случае КлНЧМ несмотря на то, что они были составлены из одиночных кристаллитов, имеющих размеры, схожие с размерами КНЧМ, значения r_2 существенно не изменялись и, главным образом, зависели от размера всего кластера (Рисунок 50Б). Важно отметить, что полученные значения r_2 для всех образцов НЧ в разы превышают аналогичное значение для коммерческого КА Feraheme® ($r_2 = 89 \text{ с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$), а также значения r_2 для кубических и сферических МНЧ аналогичных размеров, ранее описанных в литературе [3]. Такая высокая контрастирующая способность анизотропных МНЧ, в частности КНЧМ, связана с тем, что при одинаковом геометрическом объеме магнитного ядра, КНЧМ с радиусом R имеют гораздо больший эффективный объем в водном растворе, чем сферические МНЧ с радиусом r ($R \sim 1,7r$). Таким образом, эффективная площадь поверхности КНЧМ для диффузии молекул воды может быть в несколько раз больше, чем у сферических МНЧ. Кроме того, анизотропия формы КНЧМ приводит к образованию локальных градиентов магнитного поля вблизи вершин куба [131]. Оценка динамических магнитных свойств коллоидных растворов СНЧМ $D-1$ и $N-1$ выявила невысокие значения скоростей r_2 -релаксации (14 и $51 \text{ с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$, соответственно). Высокая остаточная намагниченность СНЧМ, вероятнее всего, привела к частичной агрегации СНЧМ, что повлекло за собой снижение значений параметра r_2 . При увеличении размера НЧ или размера кластеризации сверх определенного критического значения не наблюдается дальнейшего усиления флуктуирующего магнитного поля, в то время как дальнейшее увеличение размера НЧ отрицательно влияет на r_2 .

В результате, подводя итог данному разделу, важно отметить, что прямое сравнение магнитных свойств анизотропных МНЧ не всегда возможно, в связи с чем необходимо учитывать все факторы, в том числе магнитные эффекты, возникающие при упорядочивании отдельных МНЧ в кластерные структуры. В соответствии с полученными экспериментальными результатами, наилучшие контрастирующие свойства в *in vivo* МРТ-экспериментах ожидалось именно для кубических и кластерных НЧ.

3.4 *In vitro* и *in vivo* исследования

3.4.1 Исследование токсичности НЧ *in vitro*

Оценку влияния формы и размера НЧ на их токсичность *in vitro* осуществляли для НЧ, функционализированных сополимером Pluronic F-127 (НЧ@Pluronic F-127). Сравнение цитотоксичности образцов КНЧМ-15, КлНЧМ-К1 и СНЧМ-Н1, имеющих одинаковый гидродинамический размер (~ 100 нм) и схожий размер кристаллитов в диапазоне $15 - 20$ нм, на нормальных фибробластах мыши SC-1 не выявило никаких токсических эффектов вплоть до

концентраций $200 \text{ мкг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{мл}^{-1}$ (Рисунок 51), что эквивалентно уровню НЧ в плазме крови после их внутривенного введения экспериментальным мышам в дозе $5 - 10 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$ веса.

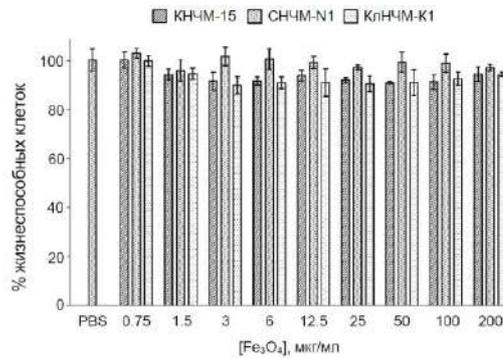


Рисунок 51 – Токсичность НЧ in vitro

Жизнеспособность клеток SC-1 оценивали с помощью MTS-теста после 48 ч совместной инкубации в культуральной среде с PBS (контроль) или НЧ в диапазоне концентраций $0,75 - 200 \text{ мкг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{мл}^{-1}$. Результаты показаны как среднее \pm SEM

Для дополнительного подтверждения биосовместимости НЧ проводили прижизненное окрашивание клеток (24 ч инкубации, $200 \text{ мкг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{мл}^{-1}$) специфическими красителями на АФК, а также апоптоз/некроз (Рисунок 52). В итоге, также не было обнаружено никаких различий в уровне АФК и маркеров клеточной гибели между контрольными клетками и клетками, обработанными НЧ.

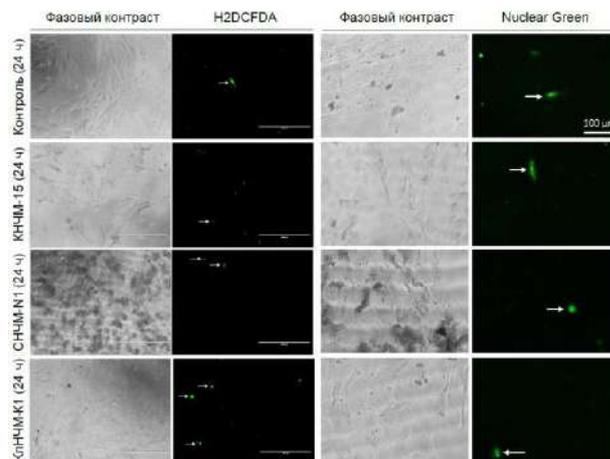


Рисунок 52 – Исследование образования АФК в клетках, обработанных НЧ (левая панель), и обнаружение апоптотических/некротических клеток после обработки НЧ (правая панель). Белые стрелки указывают на отдельные клетки с повышенным уровнем образования АФК (левая панель) и единичные мертвые клетки (правая панель)

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что в рамках проводимых экспериментов форма НЧ никак не влияла на оказываемый ими токсический эффект.

3.4.2 Исследование биораспределения НЧ *in vivo*, а также оценка перспективы их использования в качестве КА в МРТ-диагностике

Размер ядра и форма НЧ играют очень важную роль в определении эффективности КА в экспериментах по МРТ-визуализации, тогда как размер магнитного ядра и гидродинамический размер НЧ являются одними из важнейших факторов, определяющих кинетику их биораспределения [107]. НЧ с гидродинамическим размером <10 нм быстро фильтруются почками, тогда как с размером >100 нм в основном захватываются печенью и селезенкой [51]. Следовательно, регулируя гидродинамический размер НЧ, можно продлить период их циркуляции в кровотоке и полувыведения, а также увеличить сродство НЧ к опухолям [57]. Поскольку большие размеры магнитного ядра приводят к большему гидродинамическому размеру, следует найти компромисс между более высокой эффективностью визуализации и более длительным временем пребывания НЧ в кровотоке [51]. Поскольку большинство современных диагностических подходов основаны на применении сферических наноструктур, понимание эффекта от использования других форм НЧ позволит улучшить визуализацию опухолей [130]. Также стоит отметить, что кубические и кластерные НЧ менее изучены в сравнении с НЧ любых других форм [100], и влияние этих специфических форм на фармакокинетику и механизмы биораспределения НЧ до сих пор неизвестно. Помимо свойств самих НЧ, биологические факторы также определяют фармакокинетику и биораспределение НЧ. Несмотря на то, что появляется все больше работ о влиянии размера и формы НЧ на их эффективность в качестве КА в МРТ-диагностике, большая часть данных опирается на результаты отдельных исследований, где изучается всего один тип НЧ с определенными физико-химическими свойствами. Для устранения данного пробела в данной работе *in vivo* исследования проводились на трех экспериментальных опухолевых моделях: В16 (меланома), 4Т1 (рак молочной железы) и СТ26 (рак толстой кишки). Каждая из опухолей прививалась подкожно мышам инбредной линии BALB/c, после чего по достижении определенного размера опухоли внутривенно вводился коллоидный раствор НЧ@Pluronic F-127 в концентрации 5 мг НЧ·кг⁻¹ веса. Изучение влияния формы НЧ на их биораспределение, а также оценка эффективности контрастирования опухолей различного типа в МРТ-экспериментах, осуществлялись для образцов КНЧМ-15, КлНЧМ-К1 и СНЧМ-Н1, имеющих одинаковый гидродинамический размер (100 нм) и схожий размер кристаллитов.

Известно, что опухоли влияют на васкуляризацию, морфологию и функцию органов посредством диссеминации раковых клеток. В связи с этим, в начале нами было полностью изучено биораспределение НЧ по всем органам. Для этого, через 24 ч после внутривенной инъекции препаратов измеряли концентрации железа методом АЭС в органах контрольной группы мышей и группы с привитыми опухолями (Рисунок 53).

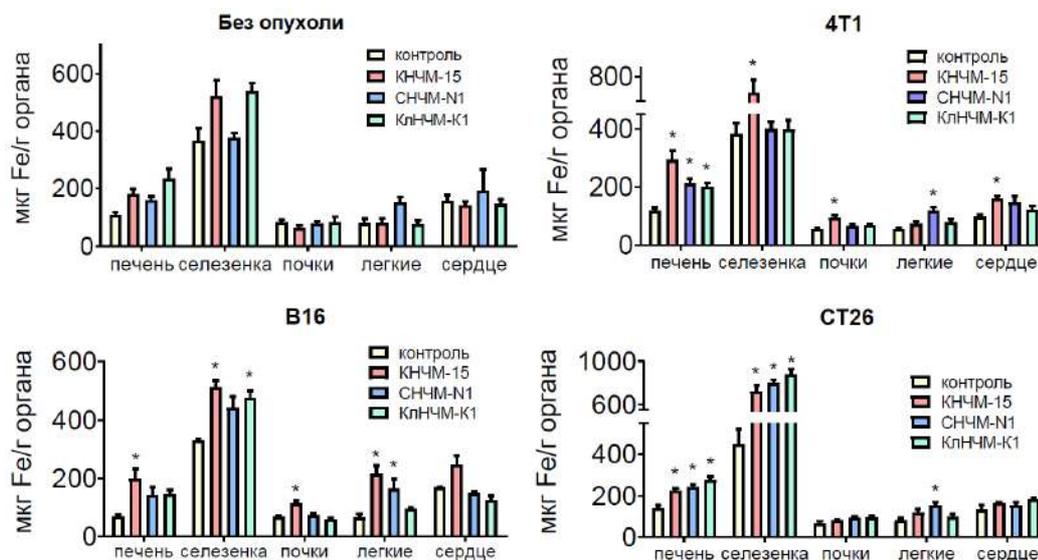


Рисунок 53 – Биораспределение НЧ по органам экспериментальных животных. Результаты показаны как среднее \pm SEM. Статистическая обработка данных проводилась с помощью t-теста Даннета ($n = 5$, $*P < 0,05$)

Несмотря на некоторую вариабельность между различными опухолевыми моделями, полученные результаты ясно указывают на то, что печень и селезенка захватили большую часть НЧ, что согласуется с многочисленными предыдущими работами. Кроме того, была зафиксирована весьма высокая концентрация СНЧМ в легких экспериментальных животных на всех типах опухолевых моделей (до $200 \text{ мкг Fe} \cdot \text{г}^{-1}$ органа), что вероятнее всего может быть связано с влиянием формы таких НЧ на снижение скорости их циркуляцию в сосудах, приводящее к увеличению адгезии СНЧМ к эндотелиальным клеткам. Ранее также были показаны существенные отличия в биораспределении золотых наностержней и наносфер по органам [13; 69; 94]. Наностержни преимущественно накапливались в лимфатических узлах, тогда как наносферы – в печени/селезенке. Однако, также в некоторых работах было показано, что золотые НЧ с высоким аспектным отношением (золотые наностержни, «наноиголки» оксида железа) демонстрируют более длительное время циркуляции по кровотоку в сравнении со сферическими аналогами [42; 126]. Такое различие в биораспределении стержневидных НЧ

можно объяснить различиями в материале и магнитных свойствах ядра НЧ. Высокая остаточная намагниченность магнитных стержневидных НЧ обуславливает их агрегацию даже в отсутствие внешних магнитных полей, приводящую к увеличению среднего размера НЧ, тогда как для золотых стержневидных НЧ такая агрегация не характерна.

В ходе проведения экспериментов также был подтвержден факт того, что накопление НЧ в солидных опухолях происходит EPR-зависимым образом и зависит от типа опухоли (Рисунок 54). Максимальный процент накопления НЧ (6,6% ID) наблюдался в опухолях В16, что превышает почти в 10 раз среднее значение для пассивной доставки (0,7%), известное из литературы, тогда как минимальное значение (0,8% ID) было получено для опухолей 4Т1, что, вероятнее всего, связано с их морфологией.

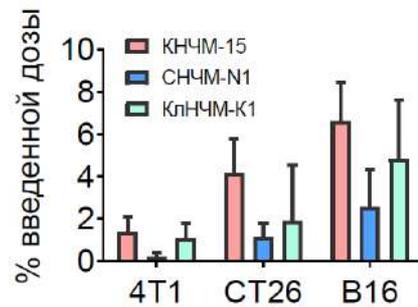


Рисунок 54 – Процент введенной дозы (ID) НЧ, доставленной к опухолям 4Т1, СТ26 и В16 через 24 часа после внутривенной инъекции НЧ. Результаты показаны как среднее \pm SEM

Эффективность доставки КНЧМ-15, СНЧМ-Н1 и КлНЧМ-К1 для всех типов опухолей составила 3,79%; 2,94%; и 1,21% ID, соответственно. В соответствии с данными биораспределения, наилучший контраст в МРТ-экспериментах был выявлен на модели В16, что согласуется с тем фактом, что ортотопические опухоли имеют тенденцию накапливать НЧ более эффективно, чем гетеротопические. В этом случае НЧ были обнаружены в 88% опухолей (Рисунок 55, Таблица 10). В случае опухолей 4Т1, дополнительное контрастирование с помощью НЧ также оказалось эффективным (82% опухолей для трех типов НЧ), в то время как для СТ26 с дополнительным контрастом было обнаружено только 63% опухолей.

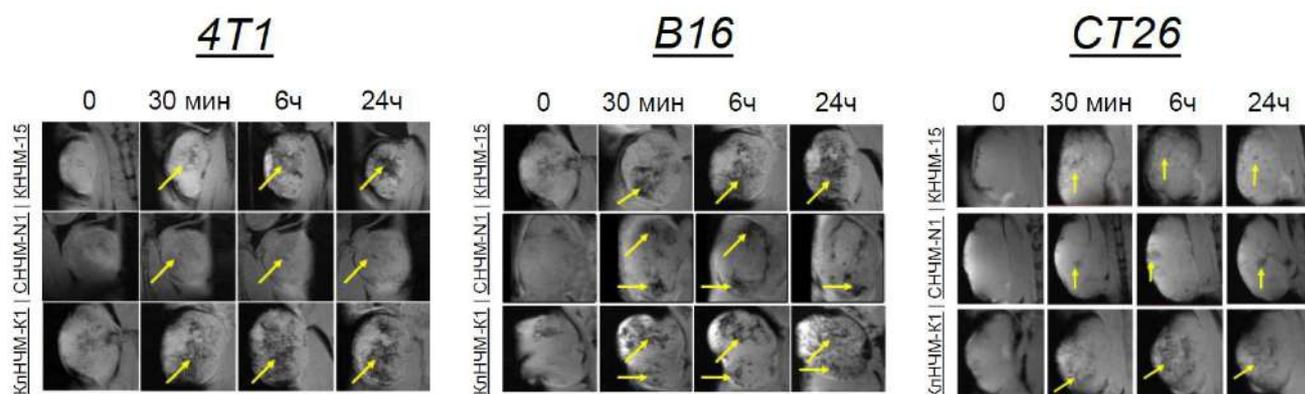


Рисунок 55 – Динамика накопления НЧ в опухолях различного типа в течение 24 ч при внутривенной инъекции коллоидного раствора НЧ ($5 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$ веса)

Среди всех исследованных НЧ, КЛНЧМ-К1 продемонстрировали наилучшее контрастирование (96% всех опухолей), что, вероятнее всего, обусловлено их наиболее выраженными магнитными свойствами. Несмотря на тот факт, что размер кристаллитов всех трех сравниваемых типов НЧ схож, в случае КЛНЧМ-К1 такие кристаллиты объединены в кластерную структуру, которая не разрушалась даже в физиологических средах и обуславливала сохранение высоких значений намагниченности насыщения и скорости r_2 -релаксации на протяжении длительного времени.

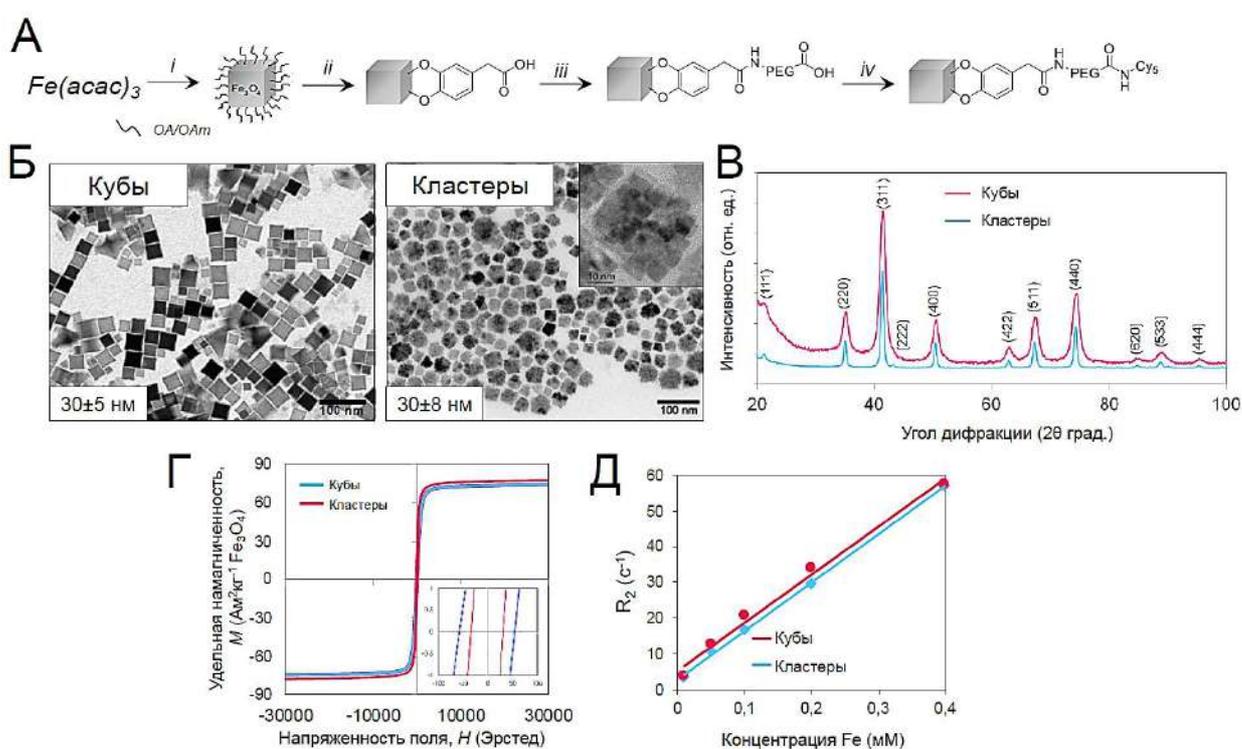
Таблица 10 – Процент опухолей с усилением контрастирования после введения НЧ

Образец	4T1	B16	CT26	Все типы опухолей
КНЧМ-15	100%	57±20%	70±15%	73±10% *
СНЧМ-Н1	60±16%	100%	30±15%	63±9% * #
КЛНЧМ-К1	100%	100%	90±10%	96±4% * #
Все типы НЧ	82±8%	88±7% **	63±9% **	78±5%

Также стоит отметить, что наиболее яркий контраст опухолей достигался на временном промежутке 6 – 24 ч после введения КНЧМ-15 и КЛНЧМ-К1, тогда как накопление СНЧМ-Н1 достигало максимума в течение первых 30 минут после введения (Рисунок 55). Такое поведение СНЧМ-Н1, вероятнее всего, обусловлено их формой, которая, как сообщалось ранее, более эффективно предотвращает неспецифическое поглощение НЧ купферовскими клетками печени в сравнении с НЧ другой формы, демонстрирующими пролонгированное кровообращение. Действительно, для СНЧМ-Н1 наблюдалось невысокое накопление в селезенке и печени, в сравнении с другими НЧ, а быстрое выведение СНЧМ-Н1 явилось причиной их низкой

эффективности доставки и низкой контрастирующей способности. Согласно литературным данным, лишь 0,7% от введенной дозы НЧ накапливается в опухоли при внутривенном введении, тогда как нами были получены намного более высокие значения, в частности для КлНЧМ-К1 и КНЧМ-15 в случае меланомы В16 (4,8% и 6,6% ID, соответственно), что подтверждает факт того, что синтезированные НЧ также могут использоваться и в адресной доставке лекарств.

Для наилучшего понимания того, как строение магнитного ядра НЧ определяет пути их биораспределения в организме, нами были дополнительно синтезированы 30 нм кластерные НЧ кубической формы (кластеры) с характеристиками, аналогичными кубическим НЧ (кубы) того же размера (Рисунок 56).

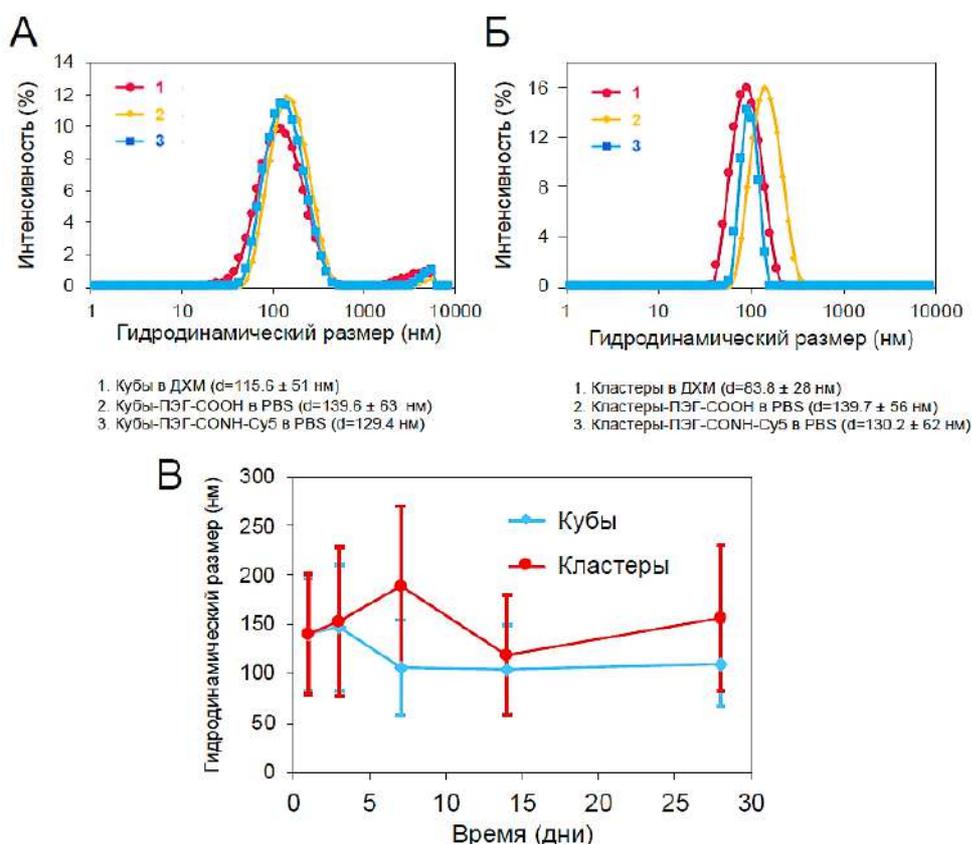


А – схематическое изображение методики синтеза и функционализации НЧ,
 Б – ПЭМ-микрофотографии кубических и кластерных НЧ (указан размер ребра куба),
 В – рентгенограммы порошков НЧ, Г – кривые намагничивания порошков НЧ при $T = 300$ К,
 Д – зависимость параметра R_2 -релаксивности протонов воды от концентрации Fe в образцах
 НЧ, функционализированных ПЭГ

Реагенты и условия: (i) ОА, ОАм, дибензиловый эфир, Ar, 296 °С, 4 ч (кубы),
 1-инданкарбоновая кислота, дибензиловый эфир, Ar, 1) 210 °С, 1 ч, 2) 260 °С, 30 мин
 (кластеры), (ii) ДФУК, MeOH/n-C₆H₁₄, 50 °С, 6 ч, (iii) СООН-PEG-NH₂, NHS/EDC, H₂O, 25 °С,
 24 ч, (iv) Cy5, NHS/EDC, H₂O, 25 °С, 24 ч

Рисунок 56 – Сравнительный анализ свойств кубических и кластерных МНЧ

Оба типа НЧ были синтезированы по методикам, описанным в разделе 1, с последующей функционализацией их поверхности органическими лигандами на основе производного ПЭГ. Гидродинамические характеристики НЧ регистрировались на каждом этапе функционализации (Рисунок 57А,Б). В начале гидрофобные НЧ, стабилизированные ОА и ОАм, были модифицированы молекулами ДФУК в реакции “обмена лигандами”. Молекулы ДФУК прочно связываются с НЧ за счет образования координационных связей Fe-O между vicинальными диолами ДФУК и атомами Fe НЧ [114]. При этом для облегчения десорбции молекул ОА или ОАм, изначально находящихся на поверхности НЧ, применялись каталитические количества NaOH, тогда как сама реакция проводилась в двухфазной системе MeOH/*n*-C₆H₁₄. Далее была проведена модификация терминальных карбоксильных групп ДФУК аминокарбокси-производным ПЭГ ($M_w = 1,1$ кДа) с использованием карбодимиидного метода, что позволило обеспечить высокую агрегативную стабильность наноконъюгатов за счет появления дополнительного стерического фактора (Рисунок 57В).



А – гидродинамические кривые коллоидных растворов кубов и кластеров на различных этапах их функционализации, Б – зависимость гидродинамического размера НЧ-ПЭГ-CONH-Cy5 от времени их инкубации при 37 °С в клеточной среде, содержащей сыворотку (концентрация НЧ в растворе составляла 0,7 мг Fe₃O₄·мл⁻¹)

Рисунок 57 – Гидродинамические характеристики коллоидных растворов МНЧ

На последнем этапе функционализации с помощью карбодимидного метода НЧ были конъюгированы с флуоресцентным красителем Су5 для возможности отслеживания их биораспределения в организме методом интравитальной микроскопии. В результате, синтезированные наноконъюгаты имели идентичные характеристики за исключением размеров кристаллитов (Таблица 11). Важно отметить, что так как кластерная НЧ состоит из небольших отдельных НЧ со средним размером 7,68(12), она имеет гораздо более высокую удельную площадь поверхности в сравнении с монокристаллической кубической НЧ. В результате, при одинаковом среднем размере магнитного ядра, кластерные НЧ могут быть функционализированы большим числом лигандов (терапевтическими молекулами и флуоресцентными маркерами). Стоит отметить, что подобного рода сравнение двух типов НЧ, отличающихся только строением магнитного ядра, было проведено впервые.

Таблица 11 – Основные характеристики сравниваемых кубических и кластерных НЧ

Образец	Размер НЧ	Размер кристаллита, нм	Гидродинамический размер, нм	ζ-потенциал, мВ	Магнитные свойства	
					J_s , $A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$	r_2 , $c^{-1} \cdot mM^{-1}$
Кубы	30±5	34,91(11)	129±60	-10,1	74	135
Кластеры	30±8	7,68(12)	130±62	-12,6	76	136

Оценка токсичности синтезированных НЧ *in vitro* проводилась на клетках рака молочной железы мыши 4Т1, которые впоследствии были использованы для моделирования опухолей *in vivo*. Кубы-ПЭГ-СООН и Кластеры-ПЭГ-СООН не проявляли цитотоксичности вплоть до концентраций 100 мкг $Fe_3O_4 \cdot ml^{-1}$ (Рисунок 58). Кластеры-ПЭГ-CONH-Су5 также не влияли на жизнеспособность клеток, в то время как Кубы-ПЭГ-CONH-Су5 оказались токсичными в максимальной концентрации. Дополнительный анализ цитотоксичности свободного красителя Су5 в диапазоне концентраций 0,03 – 8 мкг·мл⁻¹ показал, что сам краситель снижает жизнеспособность клеток 4Т1, начиная с концентрации 4 мкг·мл⁻¹. Учитывая тот факт, что в образце Кубы-ПЭГ-CONH-Су5 на 100 мкг НЧ приходилось 3 мкг красителя Су5, наблюдаемую токсичность, вероятнее всего, можно приписать свободному красителю, который мог остаться в образце, в то время как сами Кубы-ПЭГ-CONH-Су5 не вызывали дополнительной токсичности.

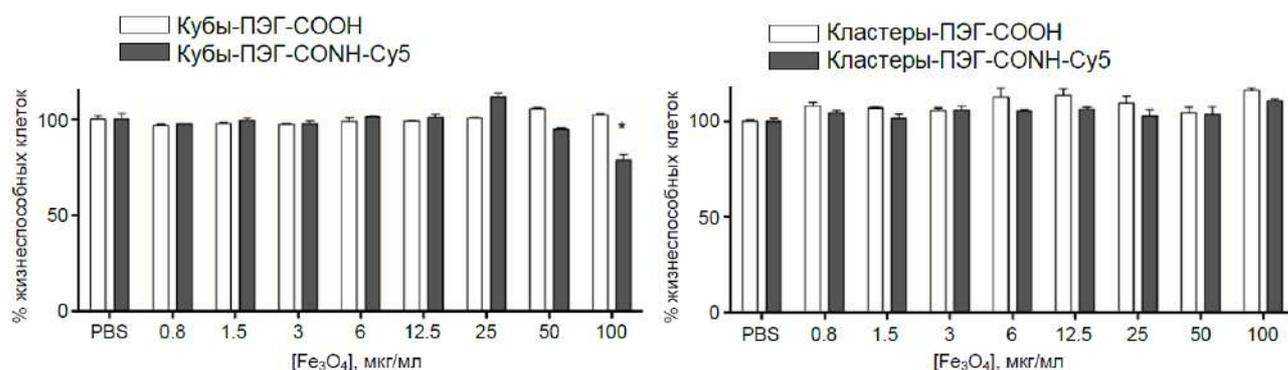


Рисунок 58 – Токсичность НЧ на клеточной культуре 4Т1, оцененная с помощью MTS-теста для немеченых и меченных флуоресцентным красителем Cy5 НЧ. Результаты показаны как среднее значение \pm SEM (* $p < 0,05$).

Токсичность кубов и кластеров также была оценена в *in vivo* экспериментах путем отслеживания веса и поведения экспериментальных животных после внутривенного введения коллоидов НЧ ($5 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$ веса). Как можно видеть из полученного графика (Рисунок 59), введение НЧ не привело к потере веса у животных или появлению каких-либо признаков заболеваемости за двухнедельный период времени. Даже после введения $10\times$ дозы НЧ, никаких побочных эффектов после инъекции зарегистрировано не было. Таким образом, синтезированные НЧ оказались биосовместимыми и безопасными.

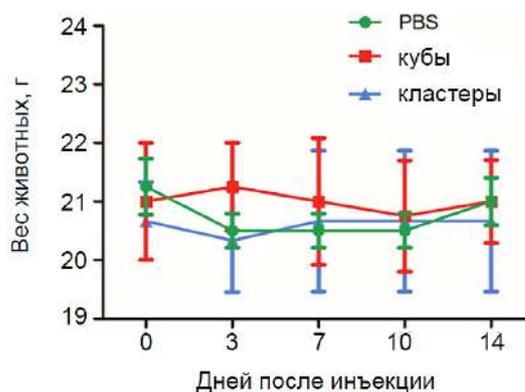
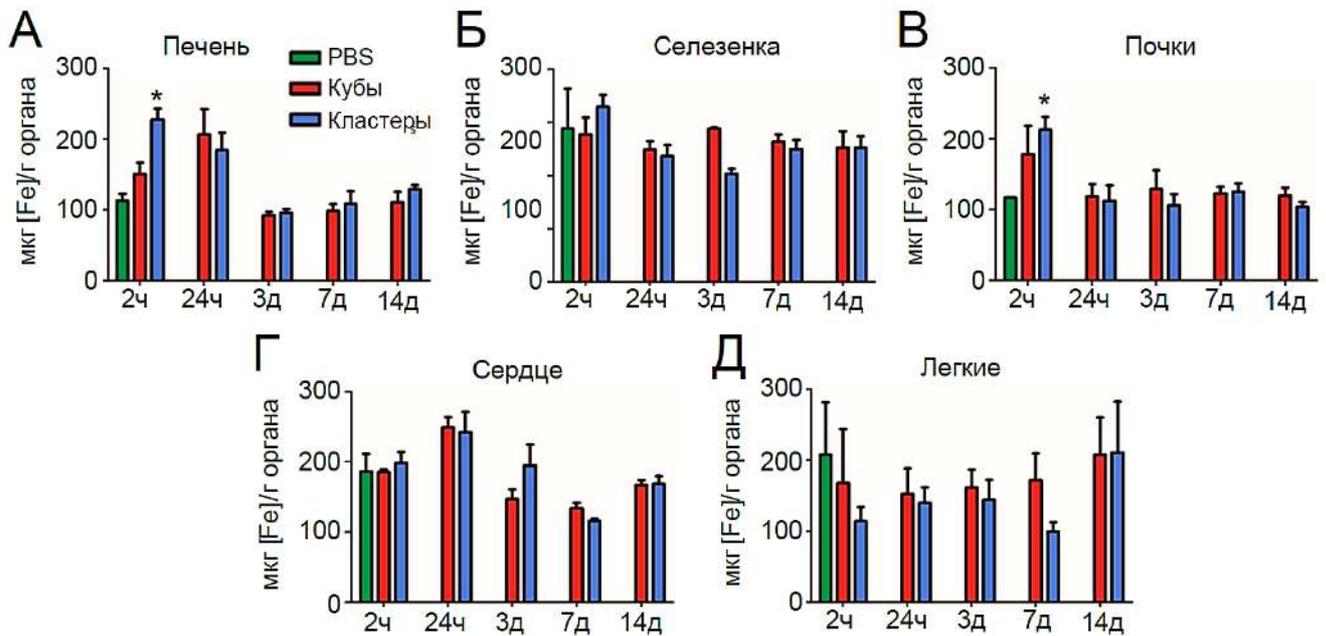


Рисунок 59 – Оценка веса экспериментальных животных в динамике после внутривенного введения $5 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$ веса ($n = 4$ для каждой группы). Результаты показаны как среднее значение \pm SEM.

Для количественной оценки биораспределения, НЧ-ПЭГ-СООН вводили внутривенно экспериментальным мышам ($5 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$ веса), после чего через определенные промежутки времени измеряли концентрации железа в органах с помощью АЭС (Рисунок 60). Оба типа НЧ

показали схожие профили биораспределения с преимущественным накоплением в печени и почках, хотя только для кластеров увеличение железа было статистически значимым в этих органах. Примечательно, что оба типа НЧ быстро выводились из организма. Концентрация железа в печени вернулась к нормальному уровню к 3 дню, а накопление НЧ в почках было обнаружено только через 2 ч после инъекции образцов. В то время как накопление НЧ в печени, имеющих гидродинамический размер 130 нм, было документально подтверждено во многих исследованиях, быстрого и временного увеличения концентрации железа в почках (предполагающего выведение с мочой) не ожидалось.



А – печень, Б – селезенка, В – почки, Г – сердце, Д – легкие

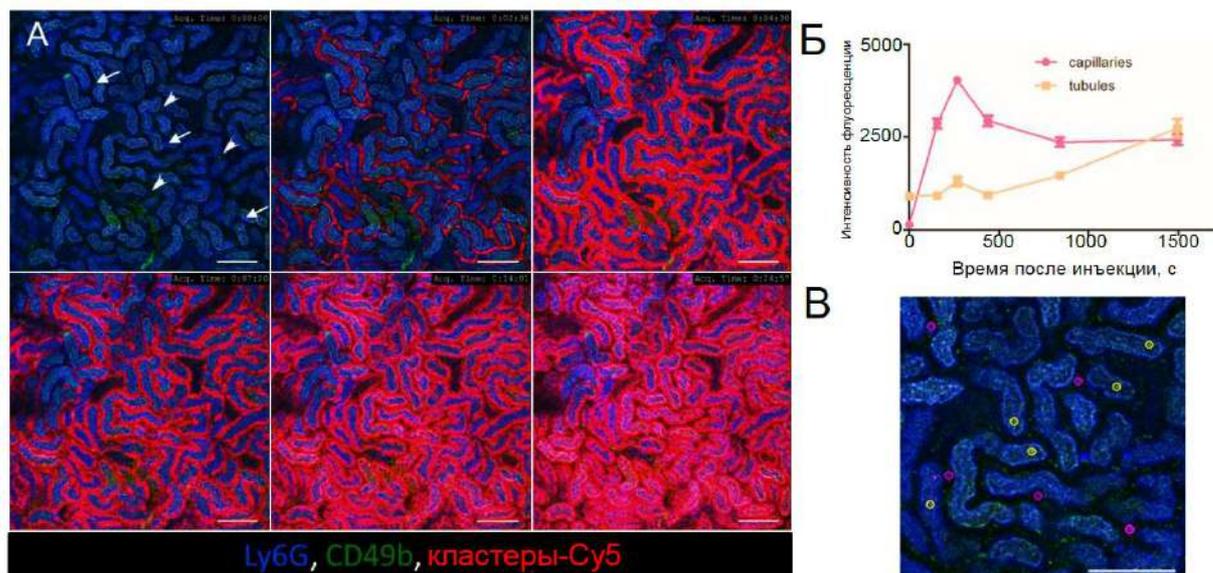
Рисунок 60 – Концентрации железа в органах экспериментальных животных при системном введении НЧ, измеренные с помощью АЭС в динамике после внутривенного введения НЧ-ПЭГ-СООН ($5 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$ веса) или PBS ($n = 4$ для каждой группы и временной точки).

Результаты представлены как средние значения \pm SEM; * $p < 0,05$ (односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Даннета).

НЧ с гидродинамическим размером >100 нм превышают не только размер пор клубочковой базальной мембраны, но и предел отсечения фенестрации, поэтому не могут ни проходить, ни накапливаться в клубочках. Почечный клиренс для крупных НЧ может быть ускорен электростатическим притяжением между клубочковой базальной мембраной и катионными НЧ [96], но в текущем исследовании и кубы, и кластеры имели отрицательный

поверхностный заряд. В действительности почечный клиренс крупных НЧ в литературе не редкость, и обычно объясняется деградацией НЧ, сопровождающейся уменьшением размера их магнитного ядра. Тем не менее появляется все больше свидетельств того, что экскреция через почки с мочой крупных НЧ с размерами от нескольких десятков до сотен нанометров происходит вне зависимости от того, деградировали НЧ или нет. На основании данных АЭС в почках через 2 ч после внутривенного введения накапливалось 6,7% ID кубов и 9,3% ID кластеров, что сопоставимо с эффективностью доставки 20 нм НЧ с ПЭГ-покрытием (7,5% ID) [92] и таких наноструктур как ДНК-оригами ($20 \% ID \cdot g^{-1}$) [31], ранее специально разработанных для нацеливания на почки.

Учитывая, что кластеры демонстрировали более выраженное накопление в почках, была проведена дополнительная визуализация поверхностной коры почек при введении Кластеры-ПЭГ-CONH-Cy5 в дозе $5 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$. На Рисунке 61А представлены покадровые снимки, снятые в течение 25 минут после инъекции НЧ. Почечные каналцы визуализировались голубым (из-за тускло-синей и тускло-зеленой автофлуоресценции), в то время как ярко-синие и зеленые сигналы соответствовали нейтрофилам и тромбоцитам, соответственно, контрастирующими с флуоресцентно-мечеными антителами. Перед инъекцией перитубулярные капилляры представляли собой темные участки между каналцами и контрастировали с циркулирующими Кластеры-ПЭГ-CONH-Cy5 в течение 2 – 3 минут после инъекции. Интенсивность окрашивания сосудов достигала максимума через 4 – 5 минут после инъекции, а затем постепенно снижалась из-за выведения НЧ из большого круга кровообращения. Напротив, сигнал Cy5 в каналцах усиливался, и в более поздние моменты времени можно ясно видеть, что большая часть флуоресценции исходит из каналцев. Рисунок 61Б демонстрирует качественный анализ накопления Кластеры-ПЭГ-CONH-Cy5 в капиллярных и трубчатых областях, изображенных на Рисунке 61В. Для проверки специфичности обнаруженного сигнала вводили соответствующую концентрацию ($15 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) свободного красителя. Сам по себе (свободный) флуорофор выводился из кровотока в течение нескольких минут, временно накапливался и концентрировался в просвете каналцев и быстро выводился, не задерживаясь в эпителии.

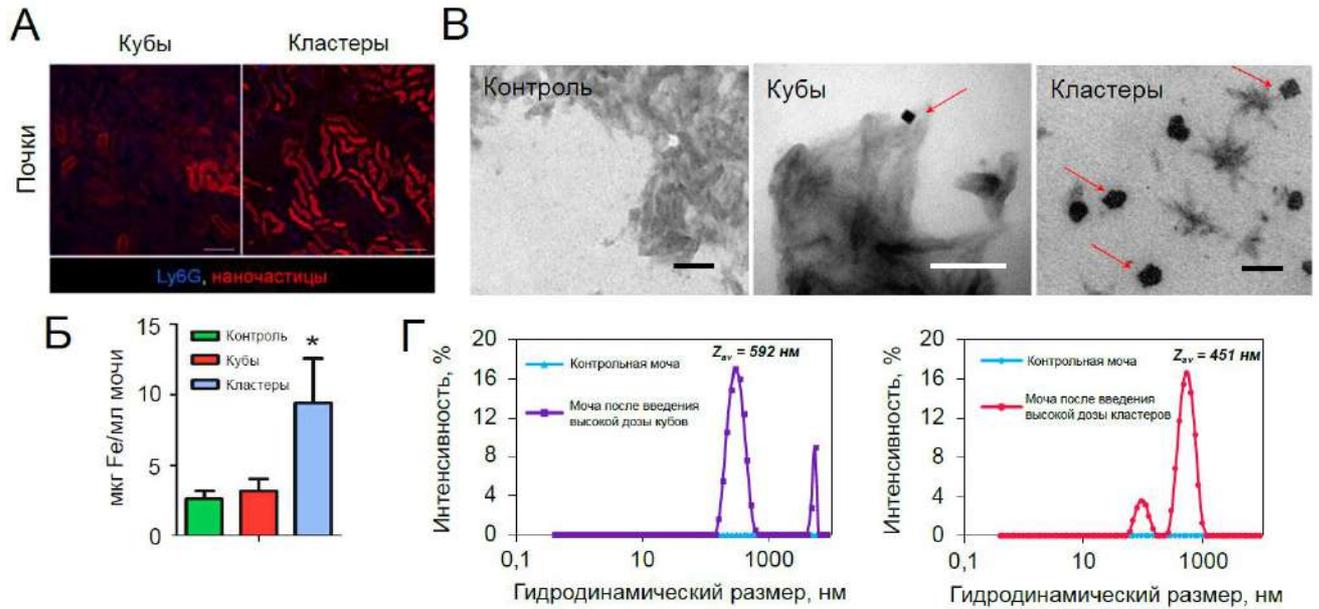


А – покадровая визуализация поверхностной коры почек при внутривенной инъекции флуоресцентно-меченых кластеров ($5 \text{ мг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{кг}^{-1}$) красный, кластеры-Cy5; синий – нейтрофилы (стрелки); зеленый – тромбоциты (стрелки), Б – динамика средней интенсивности флуоресценции Cy5 в капиллярной (розовый) и трубчатой (желтый) областях, изображенных на рисунке (В) сразу после внутривенного введения кластеров-Cy5. Масштаб: 100 мкм.

Результаты представлены как средние значения \pm SEM

Рисунок 61 – Накопление кластеров в реальном времени в базальном отделе почечных канальцев

Измерения методом АЭС выявили повышенную концентрацию железа в моче экспериментальных мышей после инъекции $10\times$ дозы Кластеры-ПЭГ-CONH-Cy5 ($50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$), а уровень железа у мышей после инъекции той же дозы Кубы-ПЭГ-CONH-Cy5 был сопоставим с контролем, обработанным PBS (Рисунок 62Б). Так как подобная картина могла быть связана с биодegradацией кластеров на более мелкие кристаллиты (кубы), из которых он состоит, моча экспериментальных мышей также была исследована методом ПЭМ. В полученных образцах мочи были обнаружены многочисленные скопления кластеров, в то время как в контрольных образцах были обнаружены только кристаллы солевых осадков (Рисунок 62В). Внешний вид кластеров в моче отличался от их первоначальной формы, и свидетельствовал о травление их поверхности, но диссоциация кластеров на более мелкие субъединицы не наблюдалась. Более того, кластеры были склонны к агрегации в моче, что было обнаружено методом ДСР (Рисунок 62Г).



А – микрофотографии конфокальной микроскопии почек через 2 ч после внутривенной инъекции кластеров-Su5 с концентрацией $5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ (шкала: 100 мкм), Б – концентрации железа, измеренные методом АЭС, в контроле и через 2 ч после внутривенного введения НЧ в дозе $50 \text{ мг НЧ} \cdot \text{кг}^{-1}$ веса, В – микрофотографии НЧ в контрольной моче и через 2 ч после внутривенного введения НЧ в дозе $50 \text{ мг НЧ} \cdot \text{кг}^{-1}$ веса, Г – гидродинамический размер НЧ в образцах мочи экспериментальных мышей после внутривенного введения НЧ в дозе $50 \text{ мг НЧ} \cdot \text{кг}^{-1}$ веса. Результаты показаны как среднее \pm SEM. Статистическая обработка данных проводилась с помощью t-теста Даннета ($n = 5$, $*p < 0,05$)

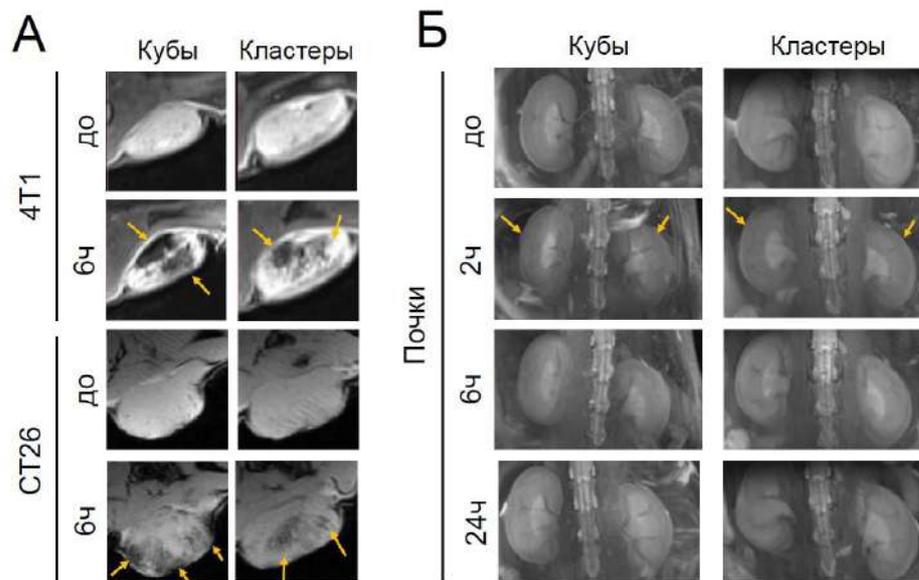
Рисунок 62 – Исследование структуры и свойств МНЧ различными инструментальными методами

Несколько более ранних исследований свидетельствуют о том, что ПЭГ-покрытие может обуславливать накопление НЧ в почках, предотвращая их захват макрофагами печени и селезенки. Более того, чем выше плотность ПЭГ на поверхности НЧ, тем больше НЧ попадает в почки. Кластер имеет более развитую площадь поверхности в сравнении с кубом, имеющим аналогичный объем магнитного ядра, и, таким образом, может быть функционализирован большим количеством молекул ПЭГ, которые облегчают их нацеливание на почки. В свою очередь, накопление кубов и кластеров в почках может быть эффективно использовано для их МРТ-визуализации, в том числе у пациентов с почечной недостаточностью, в то время как гадолиниевые Т1-КА демонстрируют острую токсичность у пациентов с заболеванием почек и не могут быть использованы для улучшения контраста [101; 134; 135]. Разработка альтернативных КА для МРТ-диагностики важна не только при патологии почек, но и для

любой

МРТ-диагностики с применением НЧ у пациентов с почечной недостаточностью.

Для оценки перспективы использования синтезированных кубов и кластеров в качестве Т2-КА была проведена МРТ-визуализация почек экспериментальных животных с опухолевыми моделями 4Т1 и СТ26 в динамике (Рисунок 63). Из полученных МР-изображений можно видеть, что периферическая зона почек подвергалась отрицательному контрастированию через 2 часа после инъекции как кубов, так и кластеров, и уровень сигнала возвращался обратно к контрольному уже через 6 часов (Рисунок 63), что дополнительно подтверждало временное накопление и выведение НЧ почками. В нескольких более ранних МРТ-исследованиях также сообщалось о быстрой почечной экскреции НЧ, размер которых превышал размер пор клубочковой базальной мембраны [82; 92; 97].



А – репрезентативные Т2-взвешенные МР-изображения опухолей 4Т1 и СТ26 до и через 6 ч после инъекции НЧ (стрелки указывают на накопление НЧ в опухолях), Б – репрезентативные МР-изображения (проекция максимальной интенсивности) почек до и через 2, 6 и 24 часа после инъекции НЧ (стрелки указывают на кору почки)

Рисунок 63 – МРТ-изображения опухолей и почек после внутривенной инъекции НЧ ($5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$).

Исследования по МРТ-визуализации опухолей 4Т1 и СТ26 с использованием кубов и кластеров также свидетельствуют о высокой эффективности контрастирования обоих типов опухолей с применением обоих типов НЧ, которая достигала максимума через 6 ч после внутривенного введения НЧ, что также согласуется с экспериментальными данными для трех типов НЧ различной формы (кубы, кластеры, стержни).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ярковыраженные магнитные свойства, биоразлагаемость и отсутствие высокой токсичности МНЧ сложных оксидов железа делает их идеальными кандидатами на роль терапевтических и диагностических агентов в биомедицине, что подтверждается ежегодным ростом научных публикаций по данной теме. Однако большинство научных работ, описывающих различные эффекты от МНЧ определенного размера на те или иные физико-химические или биологические показатели в *in vitro* и *in vivo* экспериментах, упускают ключевую деталь – морфологию таких МНЧ и полидисперсность. На основе полученных в диссертационной работе опытных данных можно сделать однозначный вывод о том, что несмотря на сходство средних размеров МНЧ магнетита, их физические и биологические свойства кардинальным образом зависят от формы и типа магнитного ядра. Даже незначительное отклонение среднего размера МНЧ на несколько нанометров приводит к резкому изменению магнитных свойств образцов, таких как намагниченность насыщения и коэрцитивность, которые являются ключевыми с точки зрения применения данного материала в качестве контрастных агентов в МРТ-диагностике. Более того, форма МНЧ, при прочих одинаковых параметрах, определяет их пути биораспределения по тканям и органам в *in vivo* экспериментах, что крайне важно знать при разработке препаратов на основе МНЧ, нацеленных на определенную биомишень. Необходимо также учитывать, что для каждого типа МНЧ, обладающего своей морфологией, существует небольшой оптимум размеров магнитного ядра, при котором достигается наилучший баланс физических, химических и биологических свойств. В связи с этим, использование в экспериментальных целях полидисперсных образцов МНЧ с разбросом средних размеров в несколько десятков нанометров является недопустимым.

Таким образом, все вышеизложенное можно свести к следующим практическим рекомендациям, которые необходимо соблюдать при получении МНЧ, исследовании их свойств и интерпретации полученных результатов:

1. При получении МНЧ химическими методами необходимо строго контролировать их морфологию, что может быть достигнуто путем подбора соответствующего типа ПАВ, концентрации реагентов, скорости нагрева реакционной смеси и продолжительности синтеза.

2. Если цель проводимого исследования заключается в установлении фундаментальных зависимостей, таких как «тип МНЧ-физические свойства-биологический отклик», не допускается использование полидисперсных образцов МНЧ, ввиду значительного усреднения получаемых результатов. Однако, только одного знания величин среднего гидродинамического размера МНЧ и размера их магнитных ядер будет недостаточно для интерпретации

проведенных с их участием *in vitro* и *in vivo* исследований. В таком случае, сравнение эффектов, наблюдаемых от МНЧ различного типа будет недостоверным.

3. Для получения монодисперсных МНЧ сложных оксидов железа с желаемой морфологией предлагается использовать метод термического разложения металлосодержащих прекурсоров. Такой метод довольно прост в осуществлении, не требует наличия сложного оборудования и трудозатрат и позволяет получать МНЧ с высоким выходом.

В свою очередь, на основании полученных в диссертационной работе экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

1. Разработаны оригинальные методики синтеза анизотропных НЧ сложных оксидов железа, которые позволяют получать монодисперсные высококристаллические кубические НЧ с размером магнитного ядра 10 – 30 нм (длина ребра куба), стержневидные НЧ с длиной 20 и 40 нм и аспектным соотношением 4:1 и 5,3:1, соответственно, и кластерные структуры различной морфологии (кубические, сферические) с размером отдельных кристаллитов от 10 до 18 нм и общим размером кластера от 23 до 41 нм. С помощью ПЭМ показано, что тип ПАВ, использованного в реакции, напрямую влияет на морфологию образующихся НЧ. Так, обнаружено, что использование мононенасыщенных производных жирных кислот приводит к образованию КНЧМ, алифатических и ароматических циклических карбоновых кислот – к образованию КлНЧМ, а использование DOPA или PEI – к образованию СНЧМ. Кроме того, показано, что размер получаемых НЧ экспоненциально зависит от концентрации ПАВ в реакционной смеси.

2. Методами РСА и мёсбауэровской спектроскопии было доказано, что полученные НЧ являются чистым магнетитом. ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием подтвердила наличие характеристических колебаний, указывающих на присутствие адсорбированных на поверхности НЧ молекул ПАВ, использованных в реакциях. Кроме того, было изучено влияние формы и размера НЧ на их статические и динамические магнитные свойства. Установлено, что значения удельной намагниченности насыщения возрастают по экспоненциальному закону по мере увеличения размера магнитного ядра НЧ и достигают значений объемного материала для 30 – 40 нм НЧ. Для кластерных НЧ продемонстрирован магнитостатический эффект, обусловленный упорядочиванием магнитных моментов отдельных кристаллитов, из которых состоит кластер, и приводящий к повышению значений намагниченности насыщения. Показано, что оптимальный диапазон размеров НЧ, позволяющий получать высокие значения скорости r_2 -релаксации ($> 300 \text{ с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$) в МРТ-экспериментах, составляет 15 – 20 нм. Также установлено, что кубическая форма НЧ является наиболее предпочтительной для получения высокого контраста при проведении МРТ-диагностики.

3. Показано, что поверхность НЧ может быть функционализована органическими лигандами за счет реализации механизмов гидрофобных взаимодействий, а также прямого ковалентного связывания НЧ непосредственно с органическим лигандом. Установлено, что использование блок-сополимеров Pluronic F-127 приводит к образованию мицелл из НЧ с гидродинамическим размером ~ 100 нм. Такие мицеллы позволяют осуществлять пассивную доставку НЧ к опухолевым образованиям за счет EPR-эффекта. Ковалентная модификация поверхности НЧ лигандами на основе производного ПЭГ иДФУК позволила функционализировать НЧ флуоресцентным красителем Cy5 и обеспечить высокую агрегативную стабильность коллоидов НЧ в физиологических условиях.

4. Установлено, что НЧ, функционализованные сополимером Pluronic F-127, не токсичны вплоть до концентраций $200 \text{ мкг Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{мл}^{-1}$, в то время как сама токсичность НЧ не зависит от их формы и размера магнитного ядра в диапазоне $10 - 40$ нм. Установлено, что биораспределение и процент накопления НЧ в органах и опухолевых образованиях напрямую связан с их типом и морфологией. Показано, что при одинаковом размере кристаллитов, КНЧМ со средним размером 15 нм лучше других НЧ накапливаются в опухолях при внутривенном введении, достигая максимального значения $6,6\%$ от введенной дозы в случае меланомы B16, что превышает почти в 10 раз среднее значение для пассивной доставки ($0,7\%$), известное из литературы. Также показано, что КЛНЧМ демонстрируют наилучший МРТ-контрастирующий эффект (выраженное накопление в $96 \pm 4\%$ опухолей всех типов), что вероятнее всего, обусловлено их морфологией и магнитостатическим эффектом. Также проведено исследование ранее не до конца изученного механизма экскреции НЧ почками и продемонстрирована возможность использования КЛНЧМ для их контрастирования, что, в свою очередь, может быть использовано в качестве альтернативы токсичным T1-КА на основе хелатных комплексов гадолиния.

Учитывая тот факт, что в настоящее время в клинической практике отсутствует безопасный аналог T1-КА для проведения МРТ-диагностики, проводимые научные исследования в этой области остаются перспективными и по сей день. Описанные в диссертационной работе методики получения анизотропных МНЧ требуют дополнительной оптимизации, так как некоторые экспериментальные параметры являются эмпирическими. В частности, требуется более детальное изучение влияния скорости нагрева реакционной смеси и продолжительности синтеза на степень полидисперсности получаемых МНЧ для выявления функциональных зависимостей и точного прогнозирования результата. Также необходимо более детальное изучение влияния типа функционального покрытия МНЧ, при прочих равных условиях, на их токсичность и биораспределение в организме.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК	активные формы кислорода
АЭС	атомно-эмиссионная спектроскопия
1,2-ГДД (1,2-HDD)	1,2-гексадекандиол
ГЦК	гранцентрированная кубическая решетка
ДМФА	диметилформамид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА (DOPA)	6-нитродофамин
ДСР	динамическое светорассеяние
ДФУК	3,4-дигидроксифенилуксусная кислота
ДХМ	дихлорметан
ДЭГ (DEG)	диэтиленгликоль
ИК	инфракрасный
КА	контрастный агент
КлНЧМ	кластерные наночастицы магнетита
КНЧМ	кубические наночастицы магнетита
МНЧ	магнитные наночастицы
МРТ	магнитно-резонансная томография
НЧ	наночастицы
НЧМ	наночастицы магнетита
ПАВ	поверхностно-активное вещество
ПЭГ (PEG)	полиэтиленгликоль
ПЭИ	полиэтиленимин
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
ПЭМВР	просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения
РФА	рентгенофазовый анализ
СНЧМ	стержневидные наночастицы магнетита
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ТЭА	триэтаноламин
ТЭГ (TEG)	триэтиленгликоль
ТЭЭГ (TEEG)	тетраэтиленгликоль
Ac	ацетат
Cy5	Цианин-5-амин
EDC	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

EPR	эффект повышенной проницаемости и удержания
EtOH	этанол
Fe(acac) ₃	ацетилацетонат железа (III)
FeOL	олеатный комплекс железа (III)
ID	введенная доза препарата
MeOH	метанол
NaOL	олеат натрия
NHS	<i>N</i> -гидроксисукцинимид
OA	олеиновая кислота
OAm	олеиламин
PBS	натрий-фосфатный буфер
PDI	индекс полидисперсности
SAR	удельный коэффициент поглощения электромагнитной энергии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A general approach to the synthesis and detailed characterization of magnetic ferrite nanocubes / Y. Xu, J. Sherwood, Y. Qin [et al.] // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – № 29. – P. 12641-12649.
2. A new bifunctional hybrid nanostructure as an active platform for photothermal therapy and MR imaging / M. Khafaji, M. Vossoughi, M. R. Hormozi-Nezhad [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 27847.
3. A new class of cubic SPIONs as a dual-mode T1 and T2 contrast agent for MRI / A. Alipour, Z. Soran-Erdem, M. Utkur [et al.] // *Magnetic Resonance Imaging*. – 2018. – Vol. 49. – P. 16-24.
4. A universal scaling law to predict the efficiency of magnetic nanoparticles as MRI T2-contrast agents / Q. L. Vuong, J. F. Berret, J. Fresnais [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2012. – Vol. 1. – № 4. – P. 502-512.
5. Albanese A. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems / A. Albanese, P. S. Tang, W. C. W. Chan // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2012. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-16.
6. Alexandridis P. Temperature Effects on Structural Properties of Pluroncc P104 and F108 PEO-PPO-PEO Block Copolymer Solutions / P. Alexandridis, T. Nivaggioli, T. A. Hatton // *Langmuir*. – 1995. – Vol. 11. – № 5. – P. 1468-1476.
7. Amstad E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications / E. Amstad, M. Textor, E. Reimhult // *Nanoscale*. – 2011. – Vol. 3. – № 7. – P. 2819-2843.
8. Anisotropic shaped iron oxide nanostructures: Controlled synthesis and proton relaxation shortening effects / Z. Zhou, X. Zhu, D. Wu [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2015. – Vol. 27. – № 9. – P. 3505-3515.
9. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging / J. H. Lee, Y. M. Huh, Y. W. Jun [et al.] // *Nature Medicine*. – 2007. – Vol. 13. – № 1. – P. 95-99.
10. Assembly of Iron Oxide Nanocubes for Enhanced Cancer Hyperthermia and Magnetic Resonance Imaging / M. Cho, A. Cervadoro, M. Ramirez [et al.] // *Nanomaterials*. – 2017. – Vol. 7. – № 4. – P. 72.
11. Batrakova E. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers / E. V. Batrakova, A. V. Kabanov // *Journal of Controlled Release*. – 2008. – Vol. 130. – № 2. – P. 98-106.
12. Biodistribution and tumors MRI contrast enhancement of magnetic nanocubes, nanoclusters, and nanorods in multiple mice models / V. Naumenko, A. Garanina, A. Nikitin [et al.] // *Contrast Media and Molecular Imaging*. – 2018. – Vol. 2018.

13. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide nanoplatelets radiotracers / L. Zhan, G. Yanxia, Z. Xiaoyong [et al.] // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2011. – Vol. 13. – № 7. – P. 2939-2947.
14. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection / J. Lipka, M. Semmler-Behnke, R. A. Sperling [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – № 25. – P. 6574-6581.
15. Bjørnerud A. The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: Theoretical consideration and applications in the cardiovascular system / A. Bjørnerud, L. Johansson // *NMR in Biomedicine*. – 2004. – Vol. 17. – № 7. – P. 465-477.
16. Brooks R. A. T2-shortening by strongly magnetized spheres: A chemical exchange model / R. A. Brooks // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 2002. – Vol. 47. – № 2. – P. 388-391.
17. Brooks R. A. On T2-shortening by strongly magnetized spheres: A partial refocusing model / R. A. Brooks, F. Moyny, P. Gillis // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 2002. – Vol. 47. – № 2. – P. 257-263.
18. Bulte J. W. M. Magnetoliposomes as contrast agents / J. W. M. Bulte, M. De Cuyper // *Methods in Enzymology*. – 2003. – Vol. 373. – P. 175-198.
19. Cancer Treatment by Magneto-Mechanical Effect of Particles, a Review / C. Naud, C. Thebault, M. Carrière [et al.] // *Nanoscale Advances*. – 2020. – Vol. 2. – P. 3632-3655.
20. Caruntu D. Magnetic properties of variable-sized Fe₃O₄ nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols / D. Caruntu, G. Caruntu, C. J. O'Connor // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2007. – Vol. 40. – № 19. – P. 5801-5809.
21. Chain-length dependence of the protein and cell resistance of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold / B. Zhu, T. Eurell, R. Gunawan, D. Leckband // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2001. – Vol. 56. – № 3. – P. 406-416.
22. Characterization and in vitro cellular uptake of PEG coated iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent / Y. J. Chen, J. Tao, F. Xiong [et al.] // *Pharmazie*. – 2010. – Vol. 65. – № 7. – P. 481-486.
23. Clusters of superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in a hydrogel: A particle architecture generating a synergistic enhancement of the T₂relaxation / C. Paquet, H. W. De Haan, D. M. Leek [et al.] // *ACS Nano*. – 2011. – Vol. 5. – № 4. – P. 3104-3112.
24. Coating optimization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for high T₂ relaxivity / S. Tong, S. Hou, Z. Zheng [et al.] // *Nano Letters*. – 2010. – Vol. 10. – № 11. – P. 4607-4613.
25. Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R₂ relaxivity / L. E. W. LaConte, N. Nitin, O. Zurkiya [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. – 2007. – Vol. 26. – № 6. – P. 1634-1641.

26. Colloidal synthesis of magnetic nanorods with tunable aspect ratios / L. Bao, W. L. Low, J. Jiang, J. Y. Ying // *Journal of Materials Chemistry*. – 2012. – Vol. 22. – № 15. – P. 7117-7120.
27. Controlled Anisotropic Growth of Co-Fe-P from Co-Fe-O Nanoparticles / A. Mendoza-Garcia, H. Zhu, Y. Yu [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2015. – Vol. 54. – № 33. – P. 9642-9645.
28. Controlled synthesis and magnetic properties of nickel phosphide and bimetallic iron–nickel phosphide nanorods / B. Singh, C. L. Ho, Y. C. Tseng, C. T. Lo // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2012. – Vol. 14. – № 2. – P. 706.
29. Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents / L. Lartigue, P. Hugouenq, D. Alloyeau [et al.] // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6. – № 12. – P. 10935-10949.
30. Distinction between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy / T. D. Clemons, R. Singh, A. Sorolla [et al.] // *Langmuir*. – 2018. – Vol. 34. – № 50. – P. 15343-15349.
31. DNA origami nanostructures can exhibit preferential renal uptake and alleviate acute kidney injury / D. Jiang, Z. Ge, H.-J. Im [et al.] // *Nature Biomedical Engineering*. – 2018. – Vol. 2. – № 11. – P. 865-877.
32. Dobson J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles / J. Dobson // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – Vol. 3. – P. 139–143.
33. Dynamic magnetic fields remote-control apoptosis via nanoparticle rotation / E. Zhang, M. F. Kircher, M. Koch [et al.] // *ACS Nano*. – 2014. – Vol. 8. – № 4. – P. 3192-3201.
34. Elongated nanoparticle aggregates in cancer cells for mechanical destruction with low frequency rotating magnetic field / Y. Shen, C. Wu, T. Q. P. Uyeda [et al.] // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7. – № 6. – P. 1735-1748.
35. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects / Z. Nemati, J. Alonso, L. M. Martinez [et al.] // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2016. – Vol. 120. – № 15. – P. 8370-8379.
36. Extravasating Neutrophils Open Vascular Barrier and Improve Liposomes Delivery to Tumors / V. A. Naumenko, K. Y. Vlasova, A. S. Garanina [et al.] // *ACS Nano*. – 2019. – Vol. 13. – № 11. – P. 12599-12612.
37. Facile microwave process in water for the fabrication of magnetic nanorods / I. Milosevic, H. Jouni, C. David [et al.] // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2011. – Vol. 115. – № 39. – P. 18999-19004.
38. Faraj A. Al. Effect of surface coating on the biocompatibility and in vivo MRI detection of iron oxide nanoparticles after intrapulmonary administration / A. Al Faraj, A. P. Shaik, A. S. Shaik //

Nanotoxicology. – 2015. – Vol. 9. – № 7. – P. 825-834.

39. Fernández-Barahona I. Microwave-driven synthesis of iron-oxide nanoparticles for molecular imaging / I. Fernández-Barahona, M. Muñoz-Hernando, F. Herranz // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 7.
40. Formation of colloidal nanocrystal clusters of iron oxide by controlled ligand stripping / J. Fu, L. He, W. Xu [et al.] // *Chemical Communications*. – 2016. – Vol. 52. – № 1. – P. 128-131.
41. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging / M. S. Martina, J. P. Fortin, C. Ménager [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – № 30. – P. 10676-10685.
42. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages / Arnida, M. M. Janát-Amsbury, A. Ray [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2011. – Vol. 77. – № 3. – P. 417-423.
43. Gillis P. Transverse relaxation of solvent protons induced by magnetized spheres: Application to ferritin, erythrocytes, and magnetite / P. Gillis, S. H. Koenig // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 1987. – Vol. 5. – № 4. – P. 323-345.
44. Growth and characterization of iron oxide nanorods/nanobelts prepared by a simple iron-water reaction / Y. M. Zhao, Y. H. Li, R. Z. Ma [et al.] // *Small*. – 2006. – Vol. 2. – № 3. – P. 422-427.
45. Highly monodisperse low-magnetization magnetite nanocubes as simultaneous T1-T2 MRI contrast agents / V. K. Sharma, A. Alipour, Z. Soran-Erdem [et al.] // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – № 23. – P. 10519-10526.
46. Highly porous, water-soluble, superparamagnetic, and biocompatible magnetite nanocrystal clusters for targeted drug delivery / F. Dong, W. Guo, J. H. Bae [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2011. – Vol. 17. – № 45. – P. 12802-12808.
47. Hwang L. P. Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids / L. P. Hwang, J. H. Freed // *The Journal of Chemical Physics*. – 1975. – Vol. 63. – № 9. – P. 4017-4025.
48. Hydrothermal synthesis, characterization, and growth mechanism of hematite nanoparticles / M. Khalil, J. Yu, N. Liu, R. L. Lee // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2014. – Vol. 16. – № 4.
49. Hydrothermal synthesis and self-assembly of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles with the magnetic and electrochemical properties / Z. J. Zhang, X. Y. Chen, B. N. Wang, C. W. Shi // *Journal of Crystal Growth*. – 2008. – Vol. 310. – № 24. – P. 5453-5457.
50. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles / T. J. Daou, G. Pourroy, S. Bégin-Colin [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2006. – Vol. 18. – № 18. – P. 4399-4404.
51. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles / H. Arami, A. Khandhar, D. Liggitt, K. M. Krishnan // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44. –

№ 23. – P. 8576-8607.

52. Influence of iron oleate complex structure on iron oxide nanoparticle formation / L. M. Bronstein, X. Huang, J. Retrum [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2007. – Vol. 19. – № 15. – P. 3624-3632.

53. Influence of microwave treatment on the dehydration of crystallohydrates of iron, cobalt and nickel flourides / S. S. Berdonosov, V. Y. Lebedev, D. G. Berdonosova [et al.] // *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*. – 2008. – Vol. 42. – № 2. – P. 15-20.

54. Infrared-active quadruple contrast FePt nanoparticles for multiple scale molecular imaging / S. W. Chou, C. L. Liu, T. M. Liu [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 85. – P. 54-64.

55. Inhibition of the cancer-associated TASK 3 channels by magnetically induced thermal release of Tetrandrine from a polymeric drug carrier / C. Shi, C. Thum, Q. Zhang [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Vol. 237. – P. 50-60.

56. Interacting superparamagnetism in La_{0.7}Sr_{0.3}MnO₃ nanoparticles / H. M. Nguyen, D. H. Manh, L. V. Hong [et al.] // *Journal of the Korean Physical Society*. – 2008. – Vol. 52. – № 5. – P. 1447-1451.

57. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics / J. E. Rosen, L. Chan, D.-B. Shieh, F. X. Gu // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 8. – № 3. – P. 275-290.

58. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues / S. Zanganeh, G. Hutter, R. Spitler [et al.] // *Nature Nanotechnology*. – 2016. – Vol. 11. – P. 986–994.

59. Iron oxide nanorods as high-performance magnetic resonance imaging contrast agents / J. Mohapatra, A. Mitra, H. Tyagi [et al.] // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – № 20.

60. Ishizaki T. Effect of particle size on the magnetic properties of Ni nanoparticles synthesized with trioctylphosphine as the capping agent / T. Ishizaki, K. Yatsugi, K. Akedo // *Nanomaterials*. – 2016. – Vol. 6. – № 9.

61. Kappe C. O. My Twenty Years in Microwave Chemistry: From Kitchen Ovens to Microwaves that aren't Microwaves / C. O. Kappe // *Chemical Record*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 15-39.

62. Kostopoulou A. Colloidal magnetic nanocrystal clusters: Variable length-scale interaction mechanisms, synergetic functionalities and technological advantages / A. Kostopoulou, A. Lappas // *Nanotechnology Reviews*. – 2015. – Vol. 4. – № 6. – P. 595-624.

63. Kouassi G. K. Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles / G. K. Kouassi, J. Irudayaraj, G. McCarty // *BioMagnetic Research and Technology*. – 2005. – Vol. 3.

64. Kralj S. Magnetic Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Clusters into Nanochains and Nanobundles / S. Kralj, D. Makovec // *ACS Nano*. – 2015. – Vol. 9. – № 10. –

P. 9700-9707.

65. Lee N. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents / N. Lee, T. Hyeon // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – Vol. 41. – № 7. – P. 2575-2589.
66. Li M. Highly sensitive magnetite nano clusters for MR cell imaging / M. Li, H. Gu, C. Zhang // *Nanoscale Research Letters*. – 2012. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-25.
67. Li Y. One-step synthesis of gradient gadolinium ironhexacyanoferrate nanoparticles: A new particle design easily combining MRI contrast and photothermal therapy / Y. Li, C. H. Li, D. R. Talham // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – № 12. – P. 5209-5216.
68. Lisjak D. Anisotropic magnetic nanoparticles: A review of their properties, syntheses and potential applications / D. Lisjak, A. Mertelj // *Progress in Materials Science*. – 2018. – Vol. 95. – P. 286-328.
69. Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging / J.-H. Park, G. von Maltzahn, L. Zhang [et al.] // *Advanced Materials*. – 2008. – Vol. 20. – № 9. – P. 1630-1635.
70. Magnetic multi-granule nanoclusters: A model system that exhibits universal size effect of magnetic coercivity / J. S. Lee, J. M. Cha, H. Y. Yoon [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5.
71. Magnetic nanoparticles in cancer theranostics / O. L. Gobbo, K. Sjaastad, M. W. Radomski [et al.] // *Theranostics*. – 2015. – Vol. 5. – № 11. – P. 1249-1263.
72. Magnetic nanotubes for magnetic-field-assisted bioseparation, biointeraction, and drug delivery / S. J. Son, J. Reichel, B. He [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – № 20. – P. 7316-7317.
73. Magnetic properties of polyvinyl alcohol and doxorubicine loaded iron oxide nanoparticles for anticancer drug delivery applications / M. Nadeem, M. Ahmad, M. S. Akhtar [et al.] // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 6.
74. Magnetite nanocrystal clusters with ultra-high sensitivity in magnetic resonance imaging / F. Xu, C. Cheng, D. X. Chen, H. Gu // *ChemPhysChem*. – 2012. – Vol. 13. – № 1. – P. 336-341.
75. Mamaeva V. Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances / V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Vol. 65. – № 5. – P. 689-702.
76. Melancon M. P. Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy / M. P. Melancon, W. Lu, C. Li // *MRS Bulletin*. – 2009. – Vol. 34. – № 06. – P. 415-421.
77. Mesoscale nanoparticles selectively target the renal proximal tubule epithelium / R. M. Williams, J. Shah, B. D. Ng [et al.] // *Nano Letters*. – 2015. – Vol. 15. – № 4. – P. 2358-2364.
78. Microwave-mediated synthesis of iron-oxide nanoparticles for use in magnetic levitation cell cultures / L. Bonfim, P. de Queiroz Souza Passos, K. de Oliveira Gonçalves [et al.] // *Applied*

Nanoscience (Switzerland). – 2019. – Vol. 9. – № 8. – P. 1707-1717.

79. Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres / H. Deng, X. Li, Q. Peng [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2005. – Vol. 44. – № 18. – P. 2782-2785.

80. Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer / J. Yang, C. H. Lee, H. J. Ko [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2007. – Vol. 46. – № 46. – P. 8836-8839.

81. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems / N. Nasongkla, E. Bey, J. Ren [et al.] // *Nano Letters*. – 2006. – Vol. 6. – № 11. – P. 2427-2430.

82. Multimodal tumor imaging by iron oxides and quantum dots formulated in poly (lactic acid)-d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles / Y. F. Tan, P. Chandrasekharan, D. Maity [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – № 11. – P. 2969-2978.

83. Nanocluster of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (dopamine) for magnetic field-targeting, highly sensitive MRI and photothermal cancer therapy / M. Wu, D. Zhang, Y. Zeng [et al.] // *Nanotechnology*. – 2015. – Vol. 26. – № 11.

84. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. / R. Ranganathan, S. Madanmohan, A. Kesavan [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2012. – Vol. 7. – P. 1043-60.

85. Novel and efficient MR active aqueous colloidal Fe₃O₄ nanoassemblies / K. C. Barick, M. Aslam, Y. P. Lin [et al.] // *Journal of Materials Chemistry*. – 2009. – Vol. 19. – № 38. – P. 7023.

86. Novel synthesis of superparamagnetic magnetite nanoclusters for biomedical applications / D. Maity, P. Chandrasekharan, P. Pradhan [et al.] // *Journal of Materials Chemistry*. – 2011. – Vol. 21. – № 38. – P. 14717-14724.

87. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T₂ contrast agents for magnetic resonance imaging / Z. Zhao, Z. Zhou, J. Bao [et al.] // *Nature Communications*. – 2013. – Vol. 4. – P. 2266.

88. Odularu A. T. Metal Nanoparticles: Thermal Decomposition, Biomedical Applications to Cancer Treatment, and Future Perspectives / A. T. Odularu // *Bioinorganic Chemistry and Applications*. – 2018. – Vol. 2018.

89. One-Step Facile Synthesis of Highly Magnetic and Surface Functionalized Iron Oxide Nanorods for Biomarker-Targeted Applications / A. Orza, H. Wu, Y. Xu [et al.] // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2017. – Vol. 9. – № 24. – P. 20719-20727.

90. Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas / O. Veisheh, C. Sun, J. Gunn [et al.] // *Nano Letters*. – 2005. – Vol. 5. – № 6. – P. 1003-1008.

91. Organic phase synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals using iron chloride as

- precursor / Z. Xu, C. Shen, Y. Tian [et al.] // *Nanoscale*. – 2010. – Vol. 2. – № 6. – P. 1027-1032.
92. PEG-copolymer-coated iron oxide nanoparticles that avoid the reticuloendothelial system and act as kidney MRI contrast agents / V. Gómez-Vallejo, M. Puigivila, S. Plaza-García [et al.] // *Nanoscale*. – 2018. – Vol. 10. – № 29. – P. 14153-14164.
93. Perez J. E. Versatile iron cobalt nanoparticles for theranostics / J. E. Perez, A. Van de Walle, C. Wilhelm // *Nature Biomedical Engineering*. – 2020. – Vol. 4. – P. 252–253.
94. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. / S.-T. Yang, J. Luo, Q. Zhou, H. Wang // *Theranostics*. – 2012. – Vol. 2. – № 3. – P. 271-82.
95. Pluronic F127-folate coated super paramagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agent for cancer diagnosis in magnetic resonance imaging / H. Vu-Quang, M. S. Vinding, T. Nielsen [et al.] // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11. – № 4.
96. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane / J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, H. Han, M. E. Davis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 8. – P. 3137-3142.
97. Polyglycerol-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles: highly efficient MRI contrast agent for liver and kidney imaging and potential scaffold for cellular and molecular imaging / N. Arsalani, H. Fattahi, S. Laurent [et al.] // *Contrast Media & Molecular Imaging*. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. 185-194.
98. Polymer-iron oxide composite nanoparticles for EPR-independent drug delivery / J. Park, N. R. Kadasala, S. A. Abouelmagd [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 101. – P. 285-295.
99. Price M. E. Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma / M. E. Price, R. M. Cornelius, J. L. Brash // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. – 2001. – Vol. 1512. – № 2. – P. 191-205.
100. Quasi-Cubic Magnetite/Silica Core-Shell Nanoparticles as Enhanced MRI Contrast Agents for Cancer Imaging / J. L. Campbell, J. Arora, S. F. Cowell [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 7. – P. e21857.
101. Rogosnitzky M. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms / M. Rogosnitzky, S. Branch // *BioMetals*. – 2016. – Vol. 29. – № 3. – P. 365-376.
102. Rotating magnetic field induced oscillation of magnetic particles for in vivo mechanical destruction of malignant glioma / Y. Cheng, M. E. Muroski, D. C. M. C. Petit [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Vol. 223. – P. 75-84.
103. Selective Nanoparticle Targeting of the Renal Tubules / R. M. Williams, J. Shah, H. S. Tian [et al.] // *Hypertension*. – 2018. – Vol. 71. – № 1. – P. 87-94.
104. Self-assembly of smallest magnetic particles / S. Mehdizadeh Taheri, M. Michaelis, T. Friedrich [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 47. –

P. 14484-14489.

105. Shape-controlled synthesis and magnetic properties of monodisperse Fe₃O₄ nanocubes / G. Gao, X. Liu, R. Shi [et al.] // *Crystal Growth and Design*. – 2010. – Vol. 10. – № 7. – P. 2888-2894.
106. Size dependence of the magnetic properties of Ni nanoparticles prepared by thermal decomposition method / X. He, W. Zhong, C. T. Au, Y. Du // *Nanoscale Research Letters*. – 2013. – Vol. 8. – № 1.
107. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. / L. Yang, H. Kuang, W. Zhang [et al.] // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – № 2. – P. 625-36.
108. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles / G. F. Goya, T. S. Berquó, F. C. Fonseca, M. P. Morales // *Journal of Applied Physics*. – 2003. – Vol. 94. – № 5. – P. 3520-3528.
109. Sterically stabilized superparamagnetic liposomes for MR imaging and cancer therapy: Pharmacokinetics and biodistribution / V. Plassat, M. S. Martina, G. Barratt [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2007. – Vol. 344. – № 1-2. – P. 118-127.
110. Strongly stretched protein resistant poly(ethylene glycol) brushes prepared by grafting-to / G. Emilsson, R. L. Schoch, L. Feuz [et al.] // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – № 14. – P. 7505-7515.
111. Superparamagnetic magnetite nanocrystal clusters: A sensitive tool for MR cellular imaging / F. Xu, C. Cheng, F. Xu [et al.] // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20. – № 40.
112. Superparamagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment / K. Hayashi, M. Nakamura, W. Sakamoto [et al.] // *Theranostics*. – 2013. – Vol. 3. – № 6. – P. 366-376.
113. Surface impact on nanoparticle-based magnetic resonance imaging contrast agents / W. Zhang, L. Liu, H. Chen [et al.] // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8. – № 9. – P. 2521-2548.
114. Surface structures of 4-chlorocatechol adsorbed on titanium dioxide / S. T. Martin, J. M. Kesselman, D. S. Park [et al.] // *Environmental Science and Technology*. – 1996. – Vol. 30. – № 8. – P. 2535-2542.
115. Synthesis, characterization and thermal properties of polymer/magnetite nanocomposites / P. Dallas, V. Georgakilas, D. Niarchos [et al.] // *Nanotechnology*. – 2006. – Vol. 17. – № 8. – P. 2046-2053.
116. Synthesis and magnetic properties of monodisperse magnetite nanocubes / H. Yang, T. Ogawa, D. Hasegawa, M. Takahashi // *Journal of Applied Physics*. – 2008. – Vol. 103.
117. Synthesis and utilization of monodisperse superparamagnetic colloidal particles for magnetically controllable photonic crystals / X. Xu, G. Friedman, K. D. Humfeld [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2002. – Vol. 14. – № 3. – P. 1249-1256.

118. Synthesis of functionalized magnetite nanoparticles using only oleic acid and iron (III) acetylacetonate / E. Scopel, P. P. Conti, D. G. Stroppa, C. J. Dalmaschio // *SN Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 1. – № 2.
119. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Control over Shape Using Imidazolium-Based Ionic Liquids / C.-M. Lee, H.-J. Jeong, S. T. Lim [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2010. – Vol. 2. – № 3. – P. 756-759.
120. Synthesis of Iron Oxide Nanorods Using a Template Mediated Approach / H. Kloust, R. Zierold, J. P. Merkl [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2015. – Vol. 27. – № 14. – P. 4914-4917.
121. Synthesis of PEGylated low generation dendrimer-entrapped gold nanoparticles for CT imaging applications / H. Liu, H. Wang, Y. Xu [et al.] // *Nanoscale*. – 2014. – Vol. 6. – № 9. – P. 4521-4526.
122. Synthesis of spherical iron-oxide nanoparticles of various sizes under different synthetic conditions / A. Stepanov, R. Mendes, M. Rümeli [et al.] // *Chemical Papers*. – 2019. – Vol. 73. – № 11. – P. 2715-2722.
123. Synthesis of ultrathin FePtPd nanowires and their use as catalysts for methanol oxidation reaction / S. Guo, S. Zhang, X. Sun, S. Sun // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133. – № 39. – P. 15354-15357.
124. Synthesis of uniform ferrimagnetic magnetite nanocubes / D. Kim, N. Lee, M. Park [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – Vol. 131. – № 2. – P. 454-455.
125. Synthesizing Iron Oxide Nanostructures: The Polyethylenimine (PEI) Role / S. Lentijo Mozo, E. Zuddas, A. Casu, A. Falqui // *Crystals*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 22.
126. Systematic Surface Engineering of Magnetic Nanoworms for In vivo Tumor Targeting / J.-H. Park, G. von Maltzahn, L. Zhang [et al.] // *Small*. – 2009. – Vol. 5. – № 6. – P. 694-700.
127. Tailor-made PEG coated iron oxide nanoparticles as contrast agents for long lasting magnetic resonance molecular imaging of solid cancers / A. Lazaro-Carrillo, M. Filice, M. J. Guillén [et al.] // *Materials Science and Engineering C*. – 2020. – Vol. 107. – P. 110262.
128. Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: Possibilities and challenges / Z. Bakhtiary, A. A. Saei, M. J. Hajipour [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2016. – Vol. 12. – № 2. – P. 287-307.
129. Textbook of Nanoscience and Nanotechnology. Textb. Nanosci. Nanotechnol. / B. S. Murty, P. Shankar, B. Raj [et al.]. – 2013.
130. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery / S. Venkataraman, J. L. Hedrick, Z. Y. Ong [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2011. – Vol. 63. – № 14-15. – P. 1228-1246.
131. The Roles of Morphology on the Relaxation Rates of Magnetic Nanoparticles / L. Yang, Z.

- Wang, L. Ma [et al.] // ACS Nano. – 2018. – Vol. 12. – № 5. – P. 4605-4614.
132. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo / X. Huang, L. Li, T. Liu [et al.] // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5. – P. 5390-5399.
133. Thiesen B. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia / B. Thiesen, A. Jordan // International Journal of Hyperthermia. – 2008. – Vol. 24. – № 6. – P. 467-474.
134. Thurman J. Recent advances in renal imaging / J. Thurman, F. Gueler // F1000Research. – 2018. – Vol. 7. – P. 1867.
135. Thurman J. M. Nanosized contrast agents to noninvasively detect kidney inflammation by magnetic resonance imaging. / J. M. Thurman, N. J. Serkova // Advances in chronic kidney disease. – 2013. – Vol. 20. – № 6. – P. 488-99.
136. Töpfer J. Nanocrystalline magnetite and Mn-Zn ferrite particles via the polyol process: Synthesis and magnetic properties / J. Töpfer, A. Angermann // Materials Chemistry and Physics. – 2011. – Vol. 129. – № 1-2. – P. 337-342.
137. Towards clinically translatable in vivo nanodiagnostics / S. M. Park, A. Aalipour, O. Vermesh [et al.] // Nature Reviews Materials. – 2017. – Vol. 2. – P. 17014.
138. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields / Y. I. Golovin, S. L. Gribanovsky, D. Y. Golovin [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2015. – Vol. 219. – P. 43-60.
139. Tunable High Aspect Ratio Iron Oxide Nanorods for Enhanced Hyperthermia / R. Das, J. Alonso, Z. Nematiporshokouh [et al.] // Journal of Physical Chemistry C. – 2016. – Vol. 120. – № 18. – P. 10086-10093.
140. Waldron R. D. Infrared spectra of ferrites / R. D. Waldron // Physical Review. – 1955. – Vol. 99. – № 6. – P. 1727-1735.
141. Wang Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application / Y.-X. J. Wang // Quant Imaging Med Surg. – 2011. – Vol. 1. – № Dcc. – P. 35-44.
142. Water-dispersible ferrimagnetic iron oxide nanocubes with extremely high r_2 relaxivity for highly sensitive in vivo MRI of tumors / N. Lee, Y. Choi, Y. Lee [et al.] // Nano Letters. – 2012. – Vol. 12. – № 6. – P. 3127-3131.
143. Zhang C. Controllable assembly of hydrophobic superparamagnetic iron oxide nanoparticle with mPEG-PLA copolymer and its effect on MR transverse relaxation rate / C. Zhang, X. Xie // Journal of Nanomaterials. – 2011. – Vol. 2011.
144. Zhang L. Sterically induced shape control of magnetite nanoparticles / L. Zhang, Y. H. Dou, H. C. Gu // Journal of Crystal Growth. – 2006. – Vol. 296. – № 2. – P. 221-226.

145. Zhang Y. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake / Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang // *Biomaterials*. – 2002. – Vol. 23. – № 7. – P. 1553-1561.