МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

# «РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА»

(ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России)

На правах рукописи

M

Абакумов Максим Артемович

# Магнитные наночастицы для биомедицины: синтез, характеристика и применение

2.6.6. «Нанотехнологии и наноматериалы»

1.5.6. «Биотехнология»

# ДИССЕРТАЦИЯ

### на соискание ученой степени

доктора химических наук

Научные консультанты:

Д.м.н., профессор В.П. Чехонин

Д.х.н., профессор А.Г. Мажуга

Москва – 2025

# Оглавление

B	веден	ие	. 4
1	Лите	ратурный обзор	11
	1.1	Структура и свойства магнитных наночастиц	11
	1.2	Теоретические основы процессов зародышеобразования	13
	1.3	Теоретические основы роста зародышей	14
	1.4	Методы синтеза НЧ оксида железа	16
	1.5	Синтез анизотропных НЧ	32
	1.6	Стабилизация поверхности НЧ	47
	1.7	Стабилизация поверхности органическими молекулами	49
	1.8	Стабилизация поверхности неорганическими покрытиями	52
	1.9	Магнитные свойства наночастиц	58
2	Резул	іьтаты	<del>)</del> 3
	2.1	Синтез НЧ	<del>)</del> 3
	2.2	Синтез стержневидных НЧ (НЧ <sub>ст</sub> )	98
	2.3	Структура и физические свойства НЧ 10	)2
	2.4	Разработка методов стабилизации НЧ в водных растворах1	15
	2.5	Исследование токсичности НЧ в экспериментах <i>in vitro</i> 12	21
	2.6	Биораспределение НЧ после внутривенного ведения 12	27
	2.7	Синтез и характеристика НЧ, несущих противоопухолевые	
	препа	араты13	32
	2.8	Исследование эффективности НЧ-СА, загруженных	10
	прот	ивоопухолевыми препаратами <i>in vitro</i> 14	10
	2.9 испо	Исследование эффективности магнитнои гипертермии (MI I) с пьзованием ФК <i>in vitro</i> 14	45
	2.10	Исследование противоопуходевой активности НЧ	49
	2.10		.,
	2.11 MPT	Исследование эффективности контрастирования опухолей методом	61
3	Обсу	жление результатов 16	58
5	3.1	Влияние ПАВ на форму НЧ 16	58
	3.1	Исспедование стабилизации НЧ биосовместимыми цизко- и	50
	высо	комолекулярными соединениями18	30
	3.3	Влияние размера и покрытия на токсичность НЧ 18	34

3.4	Влияние свойств НЧ на применение в качестве МРТ контрастных					
агентов						
3.5	Применение НЧ в тераностике	192				
4 Экспериментальная часть						
4.1	Материалы	205				
4.2	Методы	209				
Заключение						
Список сокращений						
Списс	Список литературы 22					

#### Введение

#### Актуальность темы исследования

В настоящее время магнитные наночастицы (МНЧ) используются в качестве контрастных агентов для МРТ [1] [2], при магнитной гипертермии [3][4], при магнитной сепарации клеток и молекул [5][6], в качестве перспективных средств для магнитомеханического управления активностью ферментов и жизнеспособностью клеток [7][8][9]. В основном МНЧ состоят из металлов, таких как Fe, Co, Ni, а также их простых и сложных оксидов. МНЧ, образованные чистыми металлами, крайне легко окисляются и их применение в кислородной атмосфере ограничено. Кроме того, среди вышеперечисленных металлов наиболее доступным и наименее токсичным является железо. Все это делает МНЧ, образованные простыми и сложными оксидами железа наиболее перспективными для применения в биомедицине.

Степень разработанности темы. На момент начала работ (2012 год) уже было понятно, что МНЧ являются сложным объектом для исследования, так как ИХ магнитные, функциональные свойства И потенциал биомедицинского применения обусловлены комбинацией большого числа разнообразных факторов, определяющихся методом синтеза (форма, размер, состав магнитного ядра, структура оболочки, гидродинамический размер, поверхностный заряд и т.п.). Это связано с тем, что, например, изменение размера ядра наночастицы влечет за собой изменение ее магнитных свойств, гидродинамического размера, удельной площади поверхности и т.п. Однако, помимо физико-химических свойств, данные изменения также затрагивают функциональные характеристики МНЧ, такие как Т1 и Т2 релаксивности, определяющие эффективность МНЧ в качестве контрастных средств, или способность действием ЭМ тепловыделительную под поля (SAR), определяющую эффективность МНЧ при проведении магнитной гипертермии опухолей. Для успешного применения МНЧ в биомедицинских приложениях критически важными являются такие параметры, как токсичность МНЧ, как на уровне взаимодействия с клетками, так и в масштабе всего организма, а также эффективность их доставки в целевой орган. В связи с этим крайне актуальной становится задача изучения взаимосвязи морфология/состав – свойства - биологическая активность МНЧ для оценки эффективности и потенциала применения в качестве МР-контрастных агентов, средств доставки лекарств и в магнитной гипертермии. Решение данной задачи позволит определить оптимальные характеристики МНЧ для биомедицинских применений и сократить время между лабораторной разработкой метода получения НЧ и их внедрением в клиническую практику.

Цель работы: Установление взаимосвязи формы, размера и состава, и связанных с ними физико-химических свойств МНЧ с потенциалом биомедицинского применения в качестве МР-контрастных агентов, средств доставки лекарств и в качестве лекарственных средств для магнитной гипертермии. Дизайн и разработка методов синтеза МНЧ на основе сложных оксидов для терапии и диагностики опухолей.

#### Задачи исследования:

1) Разработать химические методы синтеза МНЧ на основе сложных оксидов железа и получение наночастиц заданной формы (сферы, кубы, стержни, кластеры), размера (5-40) нм и состава;

2) Исследовать морфологию, структуру и магнитные свойства (статические и динамические) синтезированных МНЧ;

 Разработать методы функционализации поверхности МНЧ биосовместимыми покрытиями, позволяющие получать стабильные водные коллоидные растворы;

4) Исследовать влияние размера и формы МНЧ на токсичность в экспериментах *in vitro*;

5) Исследовать влияние размера и формы МНЧ на эффективность визуализации опухолей методом МРТ;

 Исследовать возможность использования МНЧ для доставки противоопухолевых препаратов различной природы (доксорубицин, бактериохлорин а) для терапии опухолей;

7) Исследовать возможность применения МНЧ феррита кобальта для терапии опухолей методом магнитной гипертермии.

### Научная новизна работы

Впервые проведено систематическое исследование взаимосвязи физикохимических и магнитных свойств МНЧ с потенциалом биомедицинского применения в качестве МР-контрастных агентов, средств доставки лекарств и в качестве лекарственных средств для магнитной гипертермии.

Разработаны препаративные методы получения МНЧ. Так, установлено, разложения ацетилацетоната железа (III) в метод термического что бензиловом спирте высококристалличные, позволяет получать монодисперсные, гидрофильные МНЧ сферической морфологии. Впервые обнаружено, что введение в реакционную смесь олеиновой кислоты и ее производных приводит к получению МНЧ кубической морфологии, алифатических и ароматических карбоновых циклических кислот кластерной морфологии, а полиэтиленимина и дофамина – стержневидной морфологии. Показано, что путем замены ацетилацетоната железа (III) на ацетилацетонат кобальта (II) в стехиометрическом соотношении могут быть получены МНЧ феррита кобальта кубической морфологии.

Впервые экспериментально показано экспоненциальное увеличение намагниченности насыщения для кубических МНЧ при увеличении размера кристаллита, тогда как для кластерных МНЧ, увеличение намагниченности насыщения определяется размером всего кластера, а не его отдельного кристаллита. Показано, что зависимость параметров T2 релаксивности и SAR от размера МНЧ имеет нелинейный характер с локальными максимумами в диапазоне размеров МНЧ 10-20 нм.

Установлено, что МНЧ, функционализированные биосовместимыми полимерами, содержащими ПЭГ, не проявляют цитотоксического действия на клеточных культурах вне зависимости от своей формы.

Обнаружено, что биосовместимое покрытие на основе сывороточного альбумина и ПЭГ обеспечивает наиболее высокое накопление МНЧ в опухолях. Показано, что морфология МНЧ определяет их распределение после внутривенного введения. Так, среди анизотропных МНЧ кубические МНЧ обладают наибольшим потенциалом в качестве контрастного средства для диагностики опухолей методом МРТ.

Установлено, что конъюгация МНЧ, покрытых сывороточным альбумином, функционализированным ПЭГ и загруженных доксорубицином, с антителами к фактору роста эндотелия сосудов позволяет повысить эффективность доставки МНЧ в опухоль и увеличить медиану выживаемости животных с аденокарциномой молочной железы 4T1.

Показано, что внутривенное введение МНЧ, покрытых сывороточным альбумином, функционализированным ПЭГ, и загруженных фотосенсибилизатором бактериохлоринового ряда позволяет определить время максимального накопления фотосенсибилизатора в опухоли путем MPT, позволяющее обеспечить максимальное торможение роста опухоли после проведения фотодинамической терапии.

Среди многообразия исследованных МНЧ только наночастицы феррита кобальта сферической морфологии с размером 12±4 нм показывают эффективность в магнитной гипертермии опухолей. Так, на примере опухоли СТ26 показано, что магнитная гипертермия приводит к излечению животных в 100% случаев.

# Теоретическая и практическая значимость работы

Определены параметры химического синтеза магнитных наночастиц, позволяющие контролировать их форму, размер и состав. Полученные

зависимости свойств магнитных наночастиц от их формы, размера и состава позволяют определить оптимальный тип МНЧ для применения в качестве контрастных средств для МРТ, доставки лекарств и терапии опухолей методом магнитной гипертермии. Разработан контрастный препарат для МРТ на основе сферических наночастиц магнетита, стабилизированных сывороточным альбумином и полиэтиенгликолем, продемонстрирована его эффективность и безопасность в диагностике опухолей. Полученные наночастицы позволяют проводить неинвазивный мониторинг накопления лекарственных препаратов в опухоли после внутривенного введения методом МРТ. Разработаны МНЧ на основе кобальтового феррита, показана их эффективность и безопасность в диагность в качестве агентов для магнитной гипертермии.

#### Методология и методы исследования

При проведении экспериментальных работ были использованы современные рентгено-фазовый аналитические методы: анализ, мёссбауэровская вибрационная спектроскопия, магнитометрия, просвечивающая электронная микроскопия, метод динамического рассеяния T2 релаксометрия, спектрофотометрия, ИК-спектроскопия, света. спектрофлуориметрия, атомно-эмиссионная спектроскопия, проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия, определение цитотоксичности методом MTS и LDH теста, оптическая томография, магнитно-резонансная томография.

Достоверность и обоснованность защищаемых научных положений, рекомендаций подтверждается достаточным объемом выводов И И результатами экспериментальных исследований, использованием современного лабораторного, пилотного и аналитического оборудования и обоснованным стандартизованных методик, использованием методов математической статистики; удовлетворительной сходимостью результатов аналитических расчетов с экспериментальными данными.

#### Положения, выносимые на защиту

1) Морфология магнитных наночастиц определяется физикохимическими свойствами поверхностно-активных веществ, растворителей и металлсодержащих прекурсоров, их соотношениями, а также скоростью нагрева и конечной температурой реакционной смеси;

2) Т2 релаксивность и тепловыделительная способность магнитных наночастиц определяются размерами и формой магнитного ядра;

 Форма магнитных наночастиц определяет параметры их фармакокинетики после внутривенного введения;

4) Модификация поверхности магнитных наночастиц биосовместимыми покрытиями, содержащими полиэтиленгликоль, позволяет водные получать стабильные коллоидные растворы наночастиц, не проявляющие токсичности В целевом лиапазоне концентраций В экспериментах, как на культуре клеток, так и при внутривенном введении;

5) Конъюгация магнитных наночастиц, несущих противоопухолевые препараты, с векторными лигандами позволяет повысить эффективность их доставки в орган-мишень и увеличить терапевтический эффект;

6) Иммобилизация фотосенсибилизаторов на поверхность магнитных наночастиц позволяет осуществить мониторинг накопления фотосенсибилизатора в опухолевом очаге методом МРТ, а также определить наиболее благоприятное время для проведения фотодинамической терапии;

7) Использование в качестве магнитной фазы феррита кобальта увеличивает тепловыделительную способность частиц, что позволяет осуществить контролируемый нагрев опухолевой ткани после интратуморального введения при магнитной гипертермии опухолей;

# Степень достоверности и апробации 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 всероссийских докладов на И международных стендовых научных конференциях, в числе которых: 11-я международная конференция «SpinS-2019» (Дуйсбург, Германия, 2019 г), Ш международная конференция «Ш International Baltic Conference on Magnetism 2019» (Калининград, Россия, 2019) международная школа-конференция «Сканирующая г). 1-я зондовая микроскопия для биологических систем» (Москва, Россия, 2019 г), III Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорадиология, лучевая диагностика и терапия» (Москва, Россия, 2020 г), Школа-конференция для молодых ученых «Органическая фотоника и полифункциональные материалы 2020» (Москва, Россия, 2020 г), 1-й международный форум и летняя школа для молодых ученых «Magnetic nanohybrids for cancer therapy» (Тессалоники, Греция, 2021 г), IV Байкальский материаловедческий форум (Улан-Удэ, Россия, 2022 г), 4-я международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем» (Москва, Россия, 2020 г) 1-я международная конференция "Armenia's Perspectives in Current Oncology Theranostics" (APRICOT) (Ереван, Армения, 2023 г), Всероссийская Конференция с международным участием «Оптогенетика+2023» (Санкт-Петербург, Россия, 2023 г), 2-й Саммит разработчиков лекарственных препаратов (Сочи, Федеральная территория «Сириус», Россия, 2024 г), Х Всероссийская научная молодежная школа-конференция «ХИМИЯ, ФИЗИКА, БИОЛОГИЯ: ПУТИ ИНТЕГРАЦИИ» (Москва, Россия, 2024 г).

# 1 Литературный обзор

### Структура и свойства магнитных наночастиц

В природе железо встречается в различных формах, из которых магнетит (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), маггемит (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и гематит (α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) являются наиболее распространенными. Кристаллическая структура гематита представлена плотнейшей упаковкой анионов кислорода, где 2/3 октаэдрических пустот заняты катионами железа. В магнетите и маггемите анионы кислорода образуют кубическую плотнейшую упаковку. В магнетите ионы железа (III) случайным образом распределены между октаэдрическими и тетраэдрическими пустотами, а ионы железа (II) находятся в октаэдрических пустотах. В маггемите же две трети вакансий упорядоченно заполнены ионами железа (III).

Благодаря четырем неспаренным электронам на 3d орбитали атом железа обладает сильным магнитным моментом. Кристаллические структуры, в состав которых входят атомы железа могут проявлять различные магнитные свойства в зависимости от расположения и ориентации магнитных моментов отдельных атомов. В парамагнитном состоянии магнитные моменты атомов ориентированы случайным образом, и в целом кристалл обладает нулевым При приложении магнитным моментом. внешнего магнитного поля магнитные моменты отдельных атомов будут стремиться выровняться относительно вектора внешнего магнитного поля. В ферромагнетиках даже магнитного поля сохраняется упорядочивание при снятии внешнего магнитных моментов в направлении приложенного внешнего поля. В антиферромагнетиках наблюдается упорядочивание двух популяций атомов, антипараллельных друг другу и равных по величине, что приводит к суммарному магнитному моменту равному нулю даже при приложении внешнего магнитного поля. В ферримагнетиках также присутствуют две

антипараллельных популяции атомов, но величина магнитного момента у них разная.

Намагниченность М является векторной удельной величиной равной сумме всех магнитных моментов атомов, находящихся в определенном объеме. Как правило, величина намагниченности меньше, чем алгебраическая сумма всех магнитных моментов атомов, так как в объёмном материале присутствуют домены, намагниченность которых не идеально параллельна между собой. При приложении внешнего поля *H* к ферромагнетику происходит постепенное увеличение намагниченности с увеличением напряженности поля Н, которое достигает максимального значения намагниченности насыщения M<sub>s</sub>. При снятии внешнего поля происходит частичное разупорядочивание доменов, что приводит к снижению значений намагниченности. Таким образом, зависимость намагниченности от внешнего магнитного поля имеет характерную кривую, называемой петлей гистерезиса. Приложение внешнего поля с противоположным направлением будет приводить к размагничиванию ферромагнетика, а величина поля, необходимая для достижения намагниченности равной нулю называется коэрцитивной силой. Также размагнитить материал можно его нагревом до определённой температуры, при которой тепловая энергия становится достаточной для разупорядочивания доменов. Такая температура называется точкой Кюри.

При уменьшении размера кристалла количество доменов в образце будет уменьшаться вплоть до размеров, при которых размер домена будет кристалла. Частицы такого равен размеру всего размера называют однодоменными. При дальнейшем уменьшении размера становится возможным достичь условий, при которых частицы становятся настолько малы, что уже при комнатной температуре происходит разупорядочивание доменов и материал перестает демонстрировать остаточную намагниченность. Такое явление называется суперпарамагнетизмом, а вещества его проявляющие называются суперпарамагнетиками. Размер частиц, при наблюдается котором ферромагнитного переход вещества ИЗ В суперпарамагнитное состояние, определяется его структурой и для магнетита примерно равен 15-30 нм [10] [11].

# Теоретические основы процессов зародышеобразования

Классическое определение зародышеобразования или нуклеации было дано в 1961 году, как процесс формирования второй фазы из однофазной системы. Для растворов формирование твердых наночастиц из раствора прекурсора как раз представляет собой процесс нуклеации. В случае, когда твердые зародыши новой фазы образуются из пересыщенного раствора, данный процесс называется гомогенной нуклеацией. Если же нуклеация происходит в присутствии других частиц или другого материала, данный процесс принято называть гетерогенной нуклеацией. При этом гетерогенная нуклеация это существенно более простой процесс, так как в системе уже присутствуют стабильные области нуклеации [12].

Гомогенная нуклеация — это термодинамический процесс, вызванный пересыщением раствора и характеризующийся свободной энергией Гиббса ( $\Delta G$ ) наночастиц, равной сумме свободной энергии поверхности и объёмного материала (1)

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma - \frac{4}{3}\pi r^3 \,\Delta G_v \tag{1}$$

где г и  $\gamma$  радиус и поверхностная энергия частицы соответственно, а  $\Delta G_{\upsilon}$  это изменение свободной энергии при образовании единицы объема частиц, описываемое формулой (2)

$$\Delta G_{\upsilon} = \frac{-2k_B T \ln(S)}{\upsilon} \tag{2}$$

где T – температура,  $k_{\rm B}$  – константа Больцмана,  $\upsilon$ - молярный объём, Sсоотношение концентрации мономера C в растворе к равновесной концентрации мономера C\* в кристалле (S = C/C\*) В гомогенном растворе процесс нуклеации сопряжен с возникновением границы раздела фаз между раствором и поверхностью твердого зародыша, что приводит к увеличению свободной энергии системы. Радиус зародыша определяется уровнем пересыщения, а быстрое и равномерное увеличение концентрации мономера способствует образованию небольших частиц. При этом свободная энергия гомогенной нуклеации  $\Delta G_{\text{гомо}}$  представляет собой минимальный энергетический барьер, который необходимо преодолеть, чтобы начать процесс нуклеации. Свободная энергия гомогенной нуклеации  $\Delta G_{\text{гомо}}$  описывается уравнением (3)

$$\Delta G_{\rm romo} = \frac{4}{3}\pi\gamma r^2 \tag{3}$$

а критический радиус зародыша, способного существовать в растворе без растворения описывается уравнением (4)

$$r_{\rm \kappa p \mu \tau} = \frac{-2\gamma}{\Delta G_{\upsilon}} = \frac{2\gamma \upsilon}{k_B T lnS} \tag{4}$$

Скорость нуклеации при этом можно выразить через уравнение Аррениуса (5)

$$\frac{\Delta N}{\Delta t} = A e^{\left(\frac{-\Delta G_{\text{FOMO}}}{k_B T}\right)}$$

$$= A e^{\left(\frac{-16\pi\gamma^3 v^2}{3k_B^3 T^3 (lnS)^2}\right)}$$
(5)

где А – предэкспоненциальный множитель. Согласно уравнению (5) скорость нуклеации зависит от экспериментальных параметров синтеза, таких как концентрация пересыщенного раствора, температура и свободная поверхностная энергия.

#### Теоретические основы роста зародышей

После нуклеации основным параметром, определяющим форму НЧ, является их дальнейший рост, который термодинамически выгоден за счет

снижения общей площади поверхности и соответственно свободной поверхностной энергии. Процесс роста включает в себя осаждение мономеров (атомы, молекулы, частицы) на поверхности НЧ из раствора. Основными лимитирующими факторами процесса роста принято считать 1) диффузию мономера к поверхности НЧ; 2) скорость взаимодействия мономера с поверхностью.

Диффузия мономера к поверхности сферической НЧ с радиусом х описывается первым законом Фика

$$\frac{dm}{dt} = JA = -4\pi r^2 D \frac{dC}{dx} \tag{6}$$

где J – диффузионный поток мономера через единицу поверхности, а D - коэффициент диффузии. При этом скорость диффузии мономера к сферической НЧ с радиусом г может быть записана в следующем виде

$$\frac{dm}{dt} = 4\pi r D (C_{\rm p} - C_{\rm r}) \tag{7}$$

где C<sub>p</sub> – концентрация мономера в растворе, C<sub>г</sub> – концентрация мономера на границе раздела фаз раствор/кристалл. Аналогично скорость реакции мономера можно записать в виде

$$\frac{dm}{dt} = 4\pi r^2 k (C_i - C_r) \tag{8}$$

где k – коэффициент массопереноса, а Ci – равновесная концентрация HЧ в растворе. Из уравнений (7) и (8) следует, что в случае высокой концентрации мономера рост определяется в основном скоростью диффузии мономера к поверхности наночастиц. Скорость диффузии мономера определяет скорость реакции, после чего мономер незамедлительно осаждается на поверхность наночастицы. В случае низкой концентрации мономера основным фактором, влияющим на скорость роста, является скорость поверхностной реакции. Как правило, при получении НЧ первоначально концентрация мономера относительно высока и основным лимитирующим фактором является

скорость диффузии, тогда как на последних стадиях скорость поверхностной реакции играет большую роль и как правило именно эти процессы отвечают за окончательную форму НЧ. Однако стоит отметить, что на стадии роста лимитированного диффузией введение органических лигандов или ПАВ, формирующих барьер для диффузии мономера к поверхности, является одним из довольно гибких и эффективных подходов для получения НЧ с заданной формой и размером [13].

# Методы синтеза НЧ оксида железа

Синтез магнитных НЧ за последнее время хорошо изучен. Химические методы получения НЧ, в отличие от физических методов получения и процессов биоминерализации, считаются более пригодными, так как позволяют контролировать распределение НЧ по размерам (однородность), контролировать размер НЧ, контролировать степень кристалличности и чистоту фазы [14]. На сегодняшний день в литературе описано большое количество методов синтеза НЧ, наиболее распространенными являются: контролируемое соосаждение в пространственно-ограниченных системах (чаще всего в микроэмульсиях), соосаждение солей железа (II) и железа (III) в щелочных водных растворах и термическое разложение лабильных прекурсоров железа В высококипящих органических растворителях. Рассмотрим эти методы подробнее.

# Метод соосаждения НЧ в микроэмульсиях

Микроэмульсионной метод является одним из наиболее часто используемых методов для получения очень малых монодисперсных НЧ. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, а именно: использование простого оборудования, использование мягких условий синтеза, при температуре близкой к температуре окружающей среды и возможность получения большого разнообразия материалов, контролируя размер и фазовый состав НЧ, образование кристалличных НЧ с высокой удельной поверхностью, что увеличивает их адсорбционную емкость, реакционную способность каталитические свойства. химическую И Традиционный микроэмульсионный метод основан на микроэмульсиях водав-масле (В/М), и он используется для получения металлических и других неорганических НЧ с начала 1980-х годов [15]. Данным методом были получены различные наноматериалы, как металлические такие И биметаллические НЧ [16,17], сложные оксиды металлов [18], квантовые точки [19] и сложные керамические наноматериалы [20]. Основная стратегия синтеза ΗЧ микроэмульсионым методом заключается В смешивании ДВУХ микроэмульсий, одна из которых содержит металлический прекурсор, а другая - осаждающий агент. При смешении оба реагента будут контактировать друг с другом с образованием осадков нанометрового размера, который будет ограничен внутренней частью капель микроэмульсии (Рисунок 1). Выбор органического растворителя не имеет решающего значения – обычно в практике используются нелетучие углеводороды, например гептан и октан.



Рисунок 1 – Схема процесса образования наночастиц в микроэмульсии

Сами микроэмульсии представляют собой прозрачные И термодинамически стабильные коллоидные дисперсии, в которых две (обычно вода изначально несмешивающиеся жидкости И масло) благодаря наличию монослоя молекул сосуществуют в одной фазе, поверхностно-активных веществ (ПАВ) со сбалансированными гидрофильнолипофильными свойствами (ГЛБ) [21]. Существует три типа микроэмульсий тип вода-в-масле (В/М) (обратные), тип масло-в-воде (М/В) (прямые) и биконтинуальные микроэмульсии (Рисунок 2) [22].



Рисунок 2 – Типы микроэмульсий: (А) Микроэмульсия М/В, (Б) Микроэмульсия В/М, (В) Биконтинуальная микроэмульсия

Для синтеза НЧ используются обратные микроэмульсии, в которых капли воды распределены в фазе неполярного растворителя. Размер капель принимает значения порядка десятков нанометров и может быть предсказуемо проконтролирован за счет варьирования соотношения вода-растворитель-ПАВ – это позволяет регулировать размер получаемых наночастиц, и повышать их монодисперсность [23]. Наиболее часто используют ПАВ такие, как одноцепочечный анионный додецилсульфат натрия (SDS) [22], катионный цетилтриметиламмоний хлорид (СТАС) или цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) [24], двухцепочечный анионный бис(2-этилгексил) сульфосукцинат натрия (Na(AOT) [25] и полиоксиэтилен октилфениловый эфир (Triton X-100) [22].

Применение данного подхода к синтезу наноматериалов (HM) довольно широко описано в литературе. Различные виды HM, которые можно получать микроэмульсионным методом, приведены ниже (Таблица 1).

Типы соединений	Наименования
Металлы и сплавы	Pt, Rh, Cu, Co, Ag, Au, Ni
Оксиды и гидроксиды металлов	$CuO, ZrO_2, CeO_2, TiO_2, Ca(OH)_2$
Полупроводники	ZnS, PbS, CdS, CdTe, ZnSe, Ce-Tb, Ce-Zr
Соли	CaCO <sub>3</sub> , Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , CaSO <sub>4</sub> , BaSO <sub>4</sub>
Магнитные соединения	$Fe_2O_3$ , $Fe_3O_4$
Полимеры	Полиалкилцианоакрилат

Таблица 1 — Виды НЧ, получаемые микроэмульсионным методом [20]

Размер наночастиц, образующихся в микроэмульсии, зависит от величины W<sub>0</sub>:

$$W_0 = \frac{\text{Объем водной фазы}}{\text{Объем ПАВ}} \tag{9}$$

Для синтеза НЧ можно использовать, как прямые (В/М), так и обратные микроэмульсии (М/В). Например, Федоренко и его коллеги сообщили о допированных гадолинием кремниевых НЧ (Gd-Si-HЧ) с использованием модифицированного метода обратной микроэмульсии. Средний размер Gd-Si-НЧ составил 40-60 нм с высокой релаксивностью, что позволило использовать их в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ). Также, в своей работе группе исследователей удалось регулируемо получить магнитные НЧ с размерами 3, 5, 7 и 9 нм за счет варьирования соотношения компонентов, образующих микроэмульсии [26]. В работе [22] было продемонстрировано, что для контролирования размера частиц также может быть использовано изменение химической структуры применяемого ПАВ – увеличение его гидрофобности ведет к образованию микроэмульсий меньшего размера, и наоборот – это имеет соответствующее влияние на размер образующихся в них частиц.

# Метод соосаждения солей в щелочных водных растворах

Метод соосаждения является одним из самых легких и удобных методов получения НЧ. Этот метод берет свое начало в 1981 года, когда Массарт впервые сообщил о синтезе магнитных НЧ в кислых и щелочных средах [27], до настоящего времени этот подход до сих пор используется для получения магнитных НЧ, особенно оксида железа. Этот метод заключается в восстановлении ионов металлов (например  $Fe^{2+}Fe^{3+}$ ) в присутствии основания (обычно используют NaOH, NH<sub>3</sub>OH, N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>OH), при температуре не выше 100° [28].

Обычно магнитные НЧ получают путем добавления основания к водной смеси хлоридов Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> в молярном соотношении 1:2, причем осажденные НЧ имеют черный цвет. Механизм реакции соосаждения Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> приведен ниже (Рисунок 3).

1. 
$$Fe^{3+} + xOH^{-} \rightarrow Fe(OH)_{x}^{3-x}$$
  
 $Fe^{2+} + yOH^{-} \rightarrow Fe(OH)_{y}^{3-y}$   
2.  $Fe(OH)_{x}^{3-x} + Fe(OH)_{y}^{3-y} \longrightarrow Fe_{3}O_{4}\downarrow$   
 $pH\approx 9-11, 60 \ ^{\circ}C$   
 $- H_{2}O$ 

Рисунок 3 - Схема, показывающая механизм реакции образования НЧ магнетита из водной смеси солей Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup>путем добавления основания. Осажденный магнетит имеет черный цвет.

Общая схема реакции может быть записана следующим образом:

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^{-} = Fe_3O_4 \downarrow + 4H_2O$$

Согласно термодинамике этой реакции, полное осаждение Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> следует ожидать между pH= 9 – 14 при сохранении молярного соотношения

 $Fe^{3+}$ : $Fe^{2+}=2:1$  в присутствии инертного газа. В противном случае  $Fe_3O_4$  может быть окислен, как показано на схеме ниже:

$$Fe_3O_4 + 0.25O_2 + 4.5H_2O = 3 Fe(OH)_3$$

Поэтому важным моментом в синтезе является контроль за концентрацией окисляющего агента – так, неконтролируемое окисление кислородом воздуха может приводить к получению немагнитных фаз оксигидроксидов железа и α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3.</sub> Обычно, это обеспечивается за счет непрерывного пропускания азота через реакционную смесь и добавления поверхностно-активных веществ, блокирующих доступ окислителей к поверхности образующихся наночастиц [29].

Преимуществами метода соосаждения являются высокий выход, высокая чистота продукта, отсутствие необходимости использования органических растворителей, легкая воспроизводимость и низкая стоимость [30,31]. Однако свойства полученных частиц, такие как размер, форма и состав, сильно зависят от параметров реакции (температуры, рН среды, ионной силы основного раствора и т. д.). Наиболее существенным недостатком метода соосаждения является высокая полидисперсность получаемых частиц. Ситуация может быть улучшена с помощью добавления в реакционную смесь вспомогательных органических веществ, таких как αгидроксикислоты, аминокислоты, поливиниловый спирт и длинноцепочечные органические кислоты, которые стабилизируют поверхность образующихся частиц и действуют как восстановительные агенты [32]. Эффект их действия определяется двумя конкурирующими механизмами: (i) процесс нуклеации, когда концентрация частиц достигает критического пересыщения и (ii) медленный рост ядер, за счет диффузии растворенных веществ на поверхности кристалла [28]. Это ведет к тому, что разные количества вспомогательного агента ведут к разному размеру получаемых частиц, что позволяет контролировать этот параметр. Также, за счет влияния на кинетику реакции на стадии нуклеации частиц и их роста, появляется возможность подбора оптимальных параметров, ведущих к получению частиц с максимальной монодисперсностью [33]. Для получения монодисперсных наночастиц эти две стадии в идеале должны быть разделены. Dong-Lin и его коллегам удалось синтезировать НЧ оксида железа для локализованной гипертермии методом соосаждения. Для предотвращения агломерации они использовали натриевую додецилбензолсульфоновой кислоты (C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>NaSO<sub>3</sub>) и соль получили сферические НЧ с диаметром от 10 до 30 нм [34]. Также Викрам и его коллеги исследовали стабильность НЧ оксида железа с различным молярным соотношением Fe<sup>2+</sup>:Fe<sup>3+</sup> с последующей стабилизацией лимонной кислотой [35]. В этой работе было показано, что размер синтезированных частиц и магнитный момент (Ms) зависят от молярного соотношения исходных компонентов солей железа Fe<sup>2+</sup>и Fe<sup>3+</sup>. Группа ученых под руководством Кришна Суренда показала, что размер магнитных НЧ, синтезированных методом соосаждения, изменяется от 6 до 14 нм при изменении концентрации прекурсора [36]. Метод соосаждения также использовался для получения парамагнитных нанокластеров на основе гадолиния для применения в МРТдиагностике. Юу и др. использовали Gd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> в качестве прекурсора и NaOH в качестве осаждающего агента в воде при 90°С в течение 2,5 ч с получением наностержней на основе Gd [37].

#### Метод термического разложения НЧ

Одним из наиболее перспективных методов получения магнитных наночастиц оксида железа на настоящий момент является термическое разложение лабильных прекурсоров железа, таких как пентакарбонил, ацетилацетонат и соли длинноцепочечных органических кислот (олеат, стеарат, пальмитат и другие) в высококипящих органических растворителях [14,38,39]. Преимуществом данного метода синтеза является возможность контроля за скоростью процессов нуклеации и роста частиц с помощью регулирования режима нагревания реакционной смеси, а также типа и количества вводимого стабилизирующего агента. Правильный подбор данных параметров позволяет существенно повысить монодисперсность получаемых частиц и точно контролировать их размер и морфологию.

Так, например, термическое разложение пентакарбонила железа (Fe(CO)<sub>5</sub>) в смеси октилового эфира и олеиновой кислоты при 100 °C, с последующим добавлением лауриновой кислоты, как стабилизатора и оксида триметиламина (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NO, приводит к образованию монодисперсных нанокристаллов у-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> размером 13 нм [40]. Разложение прекусора ацетилацетоната железа Fe(acac)<sub>3</sub> в присутствии 1,2 - гексадекандиола, олеиламина и олеиновой кислоты в фенольном эфире приводит к образованию оксидов, то есть к Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [41]. Хуйон и его коллеги [38] методом термического разложения получали монодисперсные НЧ оксида железа. В качестве исходных компонентов использовали хлорид железа (III) и олеат натрия для получения олеата железа, который затем разлагали от 240 до 320 °C в различных растворителях, таких как 1-гексадецен, октиловый эфир, 1октадецен, 1-эйкозен или триоктиламин. В зависимости от температуры разложения частицы имели размер 5-22 нм и хорошо диспергировались в неполярных органических растворителях, включая гексан и толуол. Эта же группа обнаружила, что последовательное разложение пентакарбонила железа и комплекса олеата железа при различных температурах приводит к образованию монодисперсных НЧ железа (6-15 нм), которые можно было дополнительно окислить до магнетита, что объясняется классическим механизмом Ламера. Рост наночастиц включает два периода: 1. фокусировка, во время которой размер частиц быстро увеличивается, а распределение по размерам сужается; 2. дефокусировка, когда скорость роста частиц резко снижается, а распределение по размерам расширяется [42,43]. Используя в качестве прекурсора  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  и 2-пирролидон в качестве растворителя, были получены водорастворимые НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [44]. В зависимости от времени кипячения удалось контролировать средний размер частиц, который составил 4, 12 и 60 нм при времени кипячения 1, 10 и 24 ч соответственно. Также было

отмечено, что с увеличением времени кипячения форма частиц менялась от сферической до кубической, что делает этот метод перспективным с точки зрения получения частиц заданного размера. Эта же группа ученых разработала синтез водорастворимых НЧ магнетита, полученных В аналогичных условиях с добавлением дикарбокси поли(этиленгликоля) в [45]. качестве поверхностно-активного вещества Полученные НЧ потенциально могут быть использованы в бионаномедицине в качестве контрастных агентов в МРТ диагностике. Также в литературе описаны сходные методы синтеза гидрофильных магнитных наночастиц оксида железа, использующие в качестве растворителя тетраэтиленгликоль [46], бензиловый спирт [47] и другие высококипящие спирты.

В работе [48] авторами было высказано предположение, что действительными прекурсорами в вышеописанных высокотемпературых методах синтеза являются карбоксилаты железа, образующиеся из начальных веществ при постепенном нагревании смеси. В соответствии с этим было предложено использовать вместо органических прекурсоров железа в данном методе более просто получаемый гидрооксид Fe(OH)<sub>3</sub>, с последующим образованием из него карбоксилата железа in situ. Синтетическая процедура выглядела следующим образом: свежеосажденный Fe(OH)<sub>3</sub>, полученный сливанием водных растворов FeCl<sub>3</sub> и NaOH, вводили в 1-октадецен, содержащий олеиновую кислоту, и нагревали до 320°С в атмосфере аргона. В результате, были получены частицы средним размером 10 нм, обладающие высокой степенью кристалличности, подтверждает что изначальное предположение авторов.

Вышеописанные методы синтеза, использующие в качестве стабилизаторов длинноцепочечные органические кислоты, ведут к получению частиц, обладающих гидрофобной поверхностью. В то же время, для биомедицинских применений желательно использование гидрофильных частиц, которые могут быть более просто покрыты биосовместимой оболочкой. Для получения частиц данного типа в литературе было

предложено внесение в реакционную смесь гидрофильных стабилизирующих агентов - зачастую, могут быть подобраны вещества, которые могут выступать одновременно и в роли растворителя, что дополнительно упрощает процедуру синтеза.

Кроме соосаждения и термического разложения в литературе описано большое количество альтернативных методов получения магнитных НЧ оксида железа, которые имеют меньшее распространение из-за своей сложности, однако могут получить применение в аспекте масштабирования синтеза, необходимого для промышленного производства препаратов на их основе.

# Гидротермальный метод получения НЧ

Гидротермальный ΗЧ представляет собой подход К синтезу универсальный синтез, который заключается в нагревании солей, оксидов и гидроксидов металлов в виде раствора или суспензии при высокой температуре (до 300 °C) и высоком давлении (до 100 МПа) [49,50]. Данные параметры достигаются при проведении гидротермального синтеза в автоклавах, чаще футерованных тефлоном [28]. Гидротермальный синтез проводят в двух режимах: 1) для получения нанопорошков оксидов металлов методом высокотемпературного гидролиза используют водные растворы соответствующих нитратов солей (0.01- 4мМ) с рН от 0.1 до 2.0 и 2) при гидротермальной обработке гелей гидроксидов их соосаждение проводят из растворов соответствующих нитратов (0,25-0,50 M) добавляя раствор аммиака (гидроксида натрия) при интенсивном перемешивании магнитной мешалкой до величин рН в интервале от 6.0 до 12.0. После автоклавирования синтез охлаждают до комнатной температуры. Продукт отделяют от маточного раствора фильтрованием и центрифугированием, после чего промывают несколько раз дистиллированной водой и высушивают при 80-100 °С. Главным преимуществом этого метода является простота и легкость. Размер,

кристалличность, форма и магнитные свойства НЧ зависят от параметров реакции, таких как температура, прекурсоры, время синтеза и давление [51]. Стоит отметить, что время синтеза оказывает большее влияние на форму и размер НЧ, чем исходная концентрация прекурсора. Li и др. сообщили, что получили гидротермальным методом стабильные НЧ магнетита покрытые полиэтиленимином (ПЭИ) и функционализированные фолиевой кислотой для МРТ - визуализации биологических систем [52]. Совсем недавно тот же автор опубликовал результаты по синтезу модифицированных Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au нанозвезд ядро-оболочка покрытых гиалуроновой кислотой, типа полученных гидротермальным методом в течении 3 часов при температуре 134 °C. Нанозвезды успешно были использованы для применения в визуализации и фототермической терапии опухолей. Еще один интересный результат с использованием гидротермального метода был описан Zahraei и его коллегами, которые получили НЧ ферритов Mn-Zn [53]. Полученные ферриты имели гидродинамический диаметр в диапазоне от 95 до 140 нм, который зависел от параметров синтеза. Более того, эти частицы показали суперпарамагнитные свойства с намагниченностью насыщения Ms = 47  $A*M^2/кг.$ 

Гидротермальный метод в последнее время получил широкое применение, благодаря простоте и дешевизне и возможности получения монодисперсных НЧ с размером в единицы нм.

#### Сольвотермический метод получения НЧ

Основное отличие сольвотермического и гидротермального подходов синтеза НЧ заключается в том, что прекурсор не солюбилизуется в водной фазе. Кроме того, высокая температура процесса при низких давлениях может быть достигнута с использованием органических растворителей, таких как октадецен, олеамин, этиленгликоль (ЭГ), диэтиленгликоль (ДЭГ), ацетилацетон и т.д. [49,50]. Этот подход позволяет точно контролировать форму, распределение по размерам и кристалличность, особенно для получения НЧ оксида железа. Однако, как и в гидротермальном методе, параметры реакции влияют на свойства магнитных НЧ. Например, Jiao и его коллегам удалось получить НЧ оксида железа размером 220 нм, используя в качестве растворителя ЭГ, который кипит при температуре 200 °C, время синтеза составило 10 ч [53,54]. Sun и его коллеги сообщили о синтезе 100 нм магнитных НЧ, полученных в тех же экспериментальных условиях с использованием смеси ЭГ и ДЭГ [55].

НЧ оксида железа с очень узким распределением частиц по размерам (порядка 16 нм) были получены Huang и др. (Рисунок 4) [56]. Авторы использовали октадецен в качестве растворителя в присутствии олеиновой кислоты и оксида триоктилфосфина. Смесь нагревали до 320 °C и выдерживали при этой температуре в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры и на выходе получали суперпарамагнитные (СПМ) НЧ с намагниченностью насыщения около Ms= 50 A\*м<sup>2</sup>/кг. Затем, их покрывали катионным редокс – чувствительным полиэфиримидом (ПЭфИ) и применяли для доставки генов.



Рисунок 4 – Суперпарамагнитные НЧ оксида железа (СПМ), синтезированные сольватермическим методом: А) изображение просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), Б) средний диаметр и В) кривая намагниченности

Существует очень много работ, описывающих синтез СПМ НЧ сольвотермическим методом, но данный метод может быть также использован для получения парамагнитных материалов. Например, Lou и его коллеги сообщили о синтезе парамагнитного оксида марганца сольвотермическим методом [57]. Парамагнитные наночастицы оксида марганца показали размер 186,5 нм, и после были получены многофункциональные наночастицы Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ПЭИ-Ас-FI-мПЭГ-(ПЭГ-ФК) хорошо растворимые в воде, с высокой коллоидной стабильностью, с высокой цитосовместимостью и гемосовместимостью.

#### Золь-гель метод получения НЧ

Золь-гель метод синтеза является очень распространенным жидкостным методом синтеза монодисперсных стехиометрических оксидов металлов, в том числе и магнитных. Этот метод основан на реакциях гидролиза и поликонденсации металлических прекурсоров с последующей сушкой геля и обработкой, ведущей образованию НЧ. термической К Наиболее целесообразно использовать этот метод для химических веществ, обладающих низкой растворимостью в жидкой фазе [58,59]. В данном подходе замедленная диффузия ионов железа в геле используется для контроля процесса роста частиц после нуклеации, что позволяет получать более монодисперсные наночастицы по сравнению с методом соосаждения в растворе.

Преимущество данного метода заключается в контроле размеров НЧ, возможности предопределения структуры НЧ и получения частиц с чистыми аморфными фазами [60]. Так, с помощью золь-гель метода были получены НЧ магтемита встроенные в инертную, неорганическую, прозрачную, термостойкую кремниевую матрицу. Сообщалось, что НЧ были получены в диапазоне размеров от 6 до 15 нм после прямой термообработки гелей при температуре 400 °C [61,62].

### Полиольный процесс получения НЧ

Полиольный процесс является одной из разновидностей золь-гель метода. В данном подходе используют полиолы: диэтиленгликоль (ДЭГ) и триэтиленгликоль (ТЭГ) в качестве растворителей. Такие полиолы способны растворять неорганические соединения, и в связи с их высокими температурами кипения они имеют широкий диапазон рабочих температур (от комнатной температуры до температуры кипения). Кроме того, полиолы также служат как восстановителями, так и стабилизирующими агентами для контроля роста частиц. Подобно золь-гель-методу, этот простой и недорогой метод был использован для получения СПМ НЧ оксида железа для применения в экспериментах in vivo. Например, Arteaga-Cardona и др., получили 30 нм СПМ НЧ с намагниченностью насыщения около Ms= 40-60 А\*м<sup>2</sup>/кг [63]. Wan и его коллеги сообщили о получении стабильных, монодисперсных и биосовместимых с узким распределением по размерам НЧ оксида железа, синтезированных полиольным методом, основанном на разложении Fe(acac)<sub>3</sub> в ТЭГ при повышенной температуре. Измерения намагниченности и релаксивности показали, что дисперсионное состояние НЧ оксида железа в коллоидном растворе сильно влияет на магнитное и релаксометрическое поведение, демонстрируя большие перспективы в качестве контрастного агента для МРТ [64]. В работе [65] был разработан легкий метод синтеза НЧ феррита марганца (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), который заключался в замене обычно используемых неполярных растворителей с высокой температурой кипения водорастворимыми молекулами тетраэтиленгликоля (ТЭГ). Полиол ТЭГ в этой реакции играет тройную роль в качестве высококипящего растворителя, восстановителя и стабилизатора ДЛЯ эффективного контроля роста частиц и предотвращает межчастичную агрегацию НЧ.

Преимущества и недостатки вышеупомянутых методов кратко обобщены ниже (Таблица 2).

# Другие методы синтеза НЧ

Также, одним из перспективных методов является разложение нестабильных прекурсоров железа в условиях ультразвукового воздействия. В данном методе используется эффект образования кавитационных пузырьков в растворителях при облучении их ультразвуком. В процессе схлопывания таких пузырьков происходит локальный нагрев раствора до очень высоких температур, которые достаточны для разложения прекурсора с образованием оксида железа. С помощью данного подхода в работе [66] было продемонстрировано получение аморфных частиц оксида железа из прекурсора в виде Fe(CO)<sub>5</sub> в присутствии додецил сульфата натрия в качестве стабилизирующего агента.

В качестве метода, обеспечивающего наибольшую производительность синтеза наночастиц, в литературе было предложено термическое разложение аэрозолей, содержащих соли железа. В работе [67] с помощью этого метода были получены частицы маггемита размером от 6 до 60 нм, имеющие различную морфологию, с применением в качестве прекурсоров метанольных растворов различных солей железа. Наиболее монодисперсные частицы были получены разложением ацетилацетоната железа (III).

Существует большое количество способов получения магнитных НЧ с различной формой, размером и свойствами поверхности, однако стоит отметить, что сами по себе такие НЧ в биомедицине используются крайне редко, что объясняется их низкой стабильностью в растворах, высокой токсичностью НЧ и трудностью последующей функционализации НЧ различными векторными молекулами, лекарственными препаратами, флуоресцентными метками и.т.д.

Метод синтеза	Синтез	Растворитель	Температура	ПАВ	Преимущества	Недостатки	
			и время синтеза				
Микроэмульсионный	Сложный,	Органический	20-50 °С,	Необходимы,	Относительно узкое	Низкий выход	
[69]	условия		несколько часов	добавление во	распределение		
[08]	окружающей			время реакции	размеров, хороший		
	среды				контроль формы		
Соосаждения [29]	Простой	Вода	20-90 °C,	Необходимы,	Узкое распределение	Нет контроля	
			несколько минут	добавление во	по размерам и	формы	
				время реакции	высокая		
				или после	производительность		
Термического	Сложный,	Органический	100-320 °C,	Необходимы,	Очень узкое	Необходима	
разложения [32]	инертная		часы, дни	добавление во	распределение	высокая	
	атмосфера			время реакции	размеров, хороший	температура и	
					контроль формы и	инертная	
					высокая	атмосфера	
					масштабируемость		
Гидротермальный [69]	Простой,	Вода - этанол	220 °С, от	Необходимы,	Очень узкое	Необходим	
	высокое		нескольких часов	добавление во	распределение	предел текучести	
	давление		до нескольких	время реакции	размеров и очень	при высоком	
			дней		хороший контроль	давлении	
					формы		
Полиольный [70]	Простой	Этилен,	25 °С до	Необходимы,	Равномерная форма и	Необходима	
		политэтилен	температуры	добавление во	узкое распределение	высокая	
		гликоли	кипения,	время реакции	размеров	температура	
			несколько часов				
Золь-гель метод [62]	Простой	Вода	Условия	Необходимы,	Могут быть	Продукт обычно	
			окружающей	добавление во	синтезированы	содержит	
			среды, несколько	время реакции	частицы желаемой	компонеты золь-	
			часов		формы и размера, что	гелевой матрицы	
					полезно для	на своей	
					гибридных НЧ	поверхности	

Таблица 2 — Сводная таблица сравнения химических методов синтеза НЧ

# Синтез анизотропных НЧ

# Получение НЧ Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub> кубической формы

На сегодняшний день получено большое разнообразие железооксидных НЧ различной формы и размеров, приведены их методы синтеза, а также проанализированы зависимости формы и размера полученных НЧ от реакционных условий.

Так, Haitao Yang и др. [71] описывают возможность контролируемого синтеза кубических НЧМ путем регулирования мольного соотношения исходных реагентов, таких как Fe(acac)<sub>3</sub>, ОК и олеиламин, где ОК и олеиламин выступают в роли стабилизаторов роста НЧ. Реакция проводилась в бензиловом эфире в присутствии 1,2-гексадекандиола, играющего роль восстановителя (Рисунок 5).



Рисунок 5 – ПЭМ-изображения наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> различного размера (A) 6.5 нм (Б) 15.0 нм и их гистограммы распределения по размерам (В) и (Г) соответственно (Д) электронная дифракция 15 нм НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Ряд авторов [72] также приводят в своих работах описание синтеза кубических НЧМ через ацетилацетонат железа (III) (Рисунок 6).



Рисунок 6 – ПЭМ-изображения (А) 79-нм кубических НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; (Б) смесь усеченных кубов и усеченных октаэдров со средним размером 110 нм; (В) 150-нм усеченные кубы; (Д) 22-нм кубы.

Нуеоп и соавторы [73] показали возможность синтеза монодисперсных кубических НЧ размером от 20 до 160 нм, путем термического разложения Fe(acac)<sub>3</sub> в смеси с ОК и бензиловым эфиром при 290°С.

Как было упомянуто выше, путем регулирования соотношения ПАВ, играющих роль стабилизирующих агентов, можно получать магнитные НЧ различной формы и размеров. Так Guanhua Gao и др. [74] синтезировали НЧ магнетита со средним размером 12 нм путем термического разложения ацетилацетоната железа (III) в 1-октадецене в присутствии олеиновой кислоты, олеиламина и триэтилфосфиноксида, а также показали возможность получения магнитных НЧ различной морфологии, путем контроля мольного соотношения всех реагентов и общего времени реакции.



Рисунок 7 – ПЭМ-изображения (А) 9 нм, (Б) 16 нм, (В) 22 нм кубических НЧМ

Ряд авторов приводят методы синтеза кубических НЧ магнетита, используя в качестве металлоорганического прекурсора олеатный комплекс железа (III) (Fe(OL)<sub>3</sub>). Hoang Tri Hai и соавторы синтезировали монодисперсные кубические НЧМ различного размера, используя процесс термического разложения Fe(OL)<sub>3</sub> в октадецене, в присутствии олеиновой кислоты и олеата натрия (NaOL) (Рисунок 7)[75].

Alexey Shavel и др. получили кубические НЧ магнетита, используя олеатный комплекс железа (III) в смеси с NaOL и олеиновой кислоты. В качестве растворителя применялся сквален [75].

# Получение наночастиц FexOy стержневидной формы

Магнитные НЧ оксида железа стержневидной формы представляют особый интерес для биомедицинских применений, в частности для МРТ в качестве контрастных агентов. Это обусловлено тем, что наностержни имеют более высокую площадь поверхности, по сравнению с другими формами, а также хорошую анизотропию формы, которая вносит большой вклад в значение коэрцитивной силы (H<sub>c</sub>). По сравнению, например, с НЧ сферической формы индуцированное магнитное поле стержня сильнее и, следовательно, тем сильнее магнитное поле в большом объеме приводит к повышению r<sub>2</sub> релаксации для наностержней (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Схематичное изображение магнитных полей от сферических и стержневидных МНЧ при наложении внешнего магнитного поля

Для синтеза стержневидных магнитных НЧ Haiyan Sun совместно с соавторами был разработан метод термического разложения пентакарбонила железа в присутствии ОК и гексадециламина [76]. В процессе синтеза Fe(CO)<sub>5</sub> вначале разлагается и окисляется с образованием монооксида железа (FeO). Тем временем, Fe(CO)<sub>5</sub> реагирует с ОК с образованием олеатного комплекса железа (III).

$$2Fe(CO)_{5} + 6C_{17}H_{33}COOH \rightarrow 2Fe(C_{17}H_{33}COO)_{3} + 10CO + 3H_{2}$$
$$C_{17}H_{33}COOH + C_{16}H_{33}NH_{2} \rightarrow C_{17}H_{33}CONHC_{16}H_{33} + H_{2}O$$

Путем регулирования времени реакции и количества гексадециламина можно получать стержневидные НЧМ различной длины и толщины (Рисунок 9).

Стержневидные НЧ магнетита были успешно получены в водной среде при помощи микроволнового облучения акагенита β-FeOOH в присутствии гидразингидрата в качестве восстановителя. Данный метод был подробно описан Milosovec и др. [77] и заключается в восстановлении акагенита в присутствии гидразингидрата при значениях pH от 9.5 до 11.5 и температуре 100°C (Рисунок 10).

$$12\beta$$
-FeOOH + N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> = 4Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+ 8H<sub>2</sub>O + N<sub>2</sub>

Процесс синтеза состоял из нескольких этапов: 1) получение стержневидных НЧ прекурсора (β-FeOOH) 2) синтез НЧ магнетита из прекурсора под действием микроволнового излучения.



Рисунок 9 – Рентгенограммы (А) и ПЭМ-изображения НЧ, полученных при различных временах реакции: (Б) 80 мин, (В) 100 мин, (Г) 3 ч, (Д) 6 ч, и (Е) 12ч. Размер шкалы – 50 нм



Рисунок 10 – (А) Схематическое представление двух этапов синтеза магнитных НЧ. (Б и В) Начальный (оранжевый) и конечный (черный) коллоидные растворы. (Б) НЧ диспергированные и устойчивые при рН 2. (В) растворы при рН 7 и НЧ (в агрегированном состоянии) собранные при помощи неодимового магнита. (Г) ПЭМ-изображения стержневидных НЧ оксида железа
Для получения и стабилизации НЧ стержневидной формы был использован дофамин. В отсутствии последнего полученные НЧ имели ограненные формы (Рисунок 11).



Рисунок 11 – ПЭМ – изображение НЧ β-FeOOH в отсутствии (A) и при наличии дофамина после 2 ч (Б) и 4 ч (В) реакции

В качестве восстановителей могут быть использованы и другие вещества. Так, использование олеиламина [78] в качестве мультифункционального агента (растворитель, восстановитель и стабилизатор) приводит к получению магнитных НЧ без потери исходной формы прекурсора (β-FeOOH) (Рисунок 12)



Рисунок 12 – Схема получения НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> стержневидной формы. (A) Гидролиз FeCl<sub>3</sub> в присутствии PEI (β-FeOOH, оранжевые кристаллы); (Б) восстановление β-FeOOH до Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> черные кристаллы в присутствии олеиламина) (B) Возможный механизм протекающих реакций

Изменяя количество взятого полиэтиленимина в пределах от 2 до 0,2 мл, можно получать стержневидные магнитные НЧ длиной от 30 до 70 нм (Рисунок 13).



Рисунок 13 – ПЭМ-изображения стержневидных НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> различной длины: (a) 30 нм, (b) 40 нм, (c) 50 нм, (d) 60 нм и (e) 70 нм. (f) электронная дифракция 70 нм НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>



Рисунок 14 – ПЭМ-изображения синтезированных стержневидных НЧ магнетита (A) 5 мин; (Б) 30 мин; (В) 2 ч.

Другим способом получения стержневидных магнитных НЧ является метод соосаждения солей железа  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  в щелочной среде (pH 13.2), в присутствии поливинилпирролидона (ПВП) [79]. Макромолекулы ПВП химически адсорбируются на поверхности коротких стержневидных наночастиц  $Fe_3O_4$ , тем самым предотвращая их агрегацию (Рисунок 14).

# Получение наночастиц Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub> октаэдрической и призматической форм

Ling Li и соавторами проведен комплексный обзор по методам синтеза НЧ магнетита октаэдрической и призматической форм [80]. В качестве прекурсора для синтеза 53-нм НЧ магнетита октаэдрической формы использовался ацетилацетонат железа (III) в смеси с ОК в бензиловом эфире. Кипячение полученного раствора в течение 30 мин привело к получению НЧ нужной формы (Рисунок 15).



Рисунок 15 – (А) ПЭМ-изображение 53 нм октаэдрических НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Б) Схематическая 3D-модель наночастицы октаэдрической формы

Средний размер октаэдрических НЧ магнетита может быть легко отрегулирован (от нескольких сотен до 10 нм) путем изменения количества железосодержащего прекурсора при сохранении всех остальных параметров синтеза в неизменном виде (Рисунок 16).

Например, ~ 430 нм НЧ были получены, когда исходное количество Fe(acac)<sub>3</sub> составляло 24 ммоль. Постепенное снижение количества прекурсора с 20 до 8 ммоль привело к получению магнитных НЧ со средним размером 114, 21, 18, 8 и 6 нм. Синтезированные таким образом НЧ имеют исключительно узкое распределение по размерам.



Рисунок 16 – СЭМ (А, Б) и ПЭМ (В-Д) изображения синтезированных октаэдрических НЧ магнетита с различным средним размером: (А) ~ 430 нм; (Б) 114 нм; (В) 21нм; (Г) 18нм; и (Д) 8 нм (Е) ПЭМ – изображение 6-нм сферических НЧ. Шкала: (А) 2 мкм (вставка: 100 нм); (Б) 1 мкм; и (В-Е) 50 нм

Путем изменения количества стабилизатора (ОК) могут быть получены НЧ магнетита, представленные ниже (Рисунок 17).



Рисунок 17 – ПЭМ-изображения синтезированных НЧ магнетита (А, Г) шестиугольной формы; (Б, Д) прямоугольной формы и (В, Е) параллелограммы. Шкала: (А-В) 20 нм; (Г-Е) 2 нм



Рисунок 18 – ПЭМ-изображение (А) и СЭМ-изображение (Б) гексагональных НЧМ, полученных в отсутствии олеиламина. (В) и (Г) смесь октаэдрических и кубических НЧ, полученных в присутствии 4 и 8 ммоль олеиламина соответственно

НЧ магнетита подобной формы могут быть также получены термическим разложением ацетилацетоната железа (III) в бензиловом эфире в присутствии ОК и олеиламина в качестве стабилизаторов (Рисунок 18) [81].

# Получение октаподов Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>

Чем более сложное строение имеют магнитные НЧ, тем сложнее предугадать их физико-химические свойства, и тем больший интерес они представляют для исследователей. Так, группой китайский ученых [82] были получены НЧ магнетита – октаподы – с целью их дальнейшего использования в качестве  $T_2$  контрастных агентов для МРТ (Рисунок 19). Полученные октаподы с размером ребра~30 нм проявляют умеренную намагниченность (71 А/м), но в то же время сверхвысокую  $r_2$  релаксивность (679.3±30 мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>) из-за их уникальной структуры.

Для синтеза октаподов был использован метод термического разложения олеатного комплекса железа (III) в 1-октадецене с добавлением хлорида натрия (NaCl), олеиновой кислоты и деионизованной воды. Путем изменения общего времени реакции были получены октаподы оксида железа различного размера (Рисунок 20).



Рисунок 19 – (А, Б) ПЭМ-изображение полученных НЧ оксида железа. Шкала – 100 нм (А) и 20 нм (Б). (В) ПЭМ высокого разрешения полученных НЧ. Шкала – 2 нм. (Г) ПЭМ- изображения полученных НЧ под различным углом. Шкала – 20 нм



Рисунок 20 – ПЭМ-изображение НЧ оксида железа с длиной грани (А) 14 нм, (Б) 20 нм, (В) 30 нм и (Г) 36 нм, полученные после 1, 1.5, 2 и 2.5 ч реакции соответственно в присутствии NaCl. (Д) Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия полученных НЧ, демонстрирующая пик при 198,9 эВ, отвечающий энергии связывания Cl-Fe(III). (Е) Модель, демонстрирующая, что ионы Cl могут селективно связываться с ионами Fe на поверхности октаподов в течение процесса роста НЧ. Шкала – 100 нм

Как уже было отмечено выше, для получения НЧ необычной формы могут быть использованы различные стабилизаторы, молекулы которых специфически адсорбируются на определенных гранях НЧ, препятствуя их дальнейшему росту. Так, применение 1-адамантанкарбоновой кислоты (ACA) и 1-аминоадамантана (AA) в смеси с олеиламином и 1,2-гексадекандиолом привело к получению магнитных НЧ, имеющих форму "*starlike*" (Рисунок 21) и "*flowerlike*" соответственно [83] (Рисунок 22). Использование в качестве стабилизаторов стандартной пары ОК/Олеиламина привело к образованию магнитных НЧ ограненной формы.



Рисунок 21 – Схематичная иллюстрация механизма роста НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, имеющих форму "starlike"



Рисунок 22 – ПЭМ-изображения полученных НЧ магнетита, при использовании в качестве стабилизаторов (А) ОК/олеиламин (Б) АСА/олеиламин (В) АСА/АА

# Получение тетраподов FexOy

На данный момент также получены наночастицы оксидов железа, имеющих форму тетраподов [84]. Подобные структуры удалось получить,

используя термическое разложение Fe(CO)<sub>5</sub> в 1-октадецене в присутствии OK, олеиламина и 1,2-гексадекандиола. Путем изменения количества Fe(CO)<sub>5</sub> могут быть получены тетраподы различных размеров (Рисунок 23).



Рисунок 23 – ПЭМ-изображения НЧ оксидов железа, полученных медленным нагреванием смеси до 240°С. Реакционная смесь содержала 30 г октадецена, 3 ммоль 1,2-гексадекандиола, 1.8 ммоль олеиламина, 1.8 ммоль ОК и различные количества Fe(CO)<sub>5</sub>: (A) 0.8 ммоль (Б) 1.4 ммоль (В) 2 ммоль (Г) 2.6 ммоль (Д) 3.2 ммоль (Е) 4 ммоль

При этом ключевую роль в образовании частиц подобной формы играет максимальная температура, которая в данных синтезах составляла 240°С.

Повышение температуры до 280°С привело к получению НЧ сферической формы (Рисунок 24).



Рисунок 24 – ПЭМ-изображения НЧ оксидов железа, полученных медленным нагреванием смеси до 280°С. Реакционная смесь содержала 30 г октадецена, 3 ммоль 1,2-гексадекандиола, 1.8 ммоль олеиламина, 1.8 ммоль ОК и различные количества Fe(CO)<sub>5</sub>: (A) 0.8 (Б) 2 (В) 4 ммоль

Таким образом, к настоящему моменту, получено большое разнообразие магнитных НЧ на основе оксидов железа, имеющих различную форму и размеры, которые могут быть использованы в различных областях биомедицины. Получение магнитных НЧ со строго заданными размерами и формами является одной из ключевых задач, которые требуют отдельного внимания и детального изучения.

#### Стабилизация поверхности НЧ

Методы получения НЧ нельзя отделять от методов их стабилизации. Эффективная стабилизация НЧ обеспечит присутствие индивидуальных монодисперсных НЧ, а не агломератов в растворах, сохранит поверхность НЧ пригодной для дальнейшей функционализации, а также существенно не повлияет на дальнейшие магнитные свойства материала. Для магнитных НЧ устойчивость к агрегации определятся суммарным вкладом Ван-дер-Ваальсовых, электростатических и магнитных взаимодействий между ними. Частицы являются коллоидно стабильными, когда достаточно велики силы электростатического отталкивания между ними, определяющиеся зарядом поверхности частиц. К сожалению, заряженные группы, присутствующие на поверхности частиц оксида железа, имеют изоэлектрическую точку, близкую к 6.8. [85], и поэтому в физиологических условиях частицы без покрытия склонны агрегировать.

Также, для осуществления направленной доставки лекарственных препаратов и визуализирующих агентов, а также осуществления активного нацеливания с помощью биомолекул, необходимо их связывание на поверхности частиц. В большинстве случаев прямое взаимодействие таких молекул с функциональными группами, присутствующими на поверхности частиц, получаемых вышеописанными методами синтеза, невозможно, поэтому логичным шагом является введение промежуточного покрытия, которое будет обладать активными группами, оптимально взаимодействующими с целевыми биомолекулами.

Важные факторы, которые следует учитывать при выборе стабилизирующего агента:

- Гидрофильность и наличие электростатического заряда на поверхности НЧ в физиологических буферах, обеспечивающих коллоидную стабильность НЧ;
- Наличие на поверхности НЧ функциональных групп, способных легко производить конъюгацию с целевыми биомолекулами;
- 3) Биосовместимость и биодеградируемость.

Для модификации поверхности НЧ используют материалы, как неорганической [86–88], так и органической природы [89–92] (Рисунок 25), включая полимерные материалы, которые в свою очередь делятся на синтетические и натуральные.



Рисунок 25 – Органические и неорганические покрытия НЧ

Полимеры на основе полиэтиленвинилацетата, поливинилпирролидона (ПВП), поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (ПЛГА), полиэтиленгликоля (ПЭГ), поливинилового спирта (ПВС) и др. относятся к типичным синтетическим покрытиям [89,93,94]. К натуральным полимерным покрытиям относят декстран, хитозан, пуллан и др. [91,92,95–97]. Различные ПАВ,

например, такие как олеат натрия, додециламин, карбоксиметилцеллюлоза, также обычно используются для повышения диспергируемости в водной среде [98–100]. Покрытия такого типа препятствуют агрегации НЧ, а также предотвращают окисление магнетита, что является принципиально важным при транспорте НЧ по кровотоку.

Правильный выбор покрытия во многом определяет весь спектр физикохимических, биологических и других свойств магнитных НЧ. Если НЧ оксида железа выступают в качестве наноплатформы для доставки лекарственного препарата, то выбор типа покрытия будет определяться типом и свойствами препарата, а также способом загрузки. Ниже постараемся выделить основные типы покрытий, применяемые для создания таргетного агента на основе магнитных НЧ.

# Стабилизация поверхности органическими молекулами

# Полимеры

В последние годы НЧ оксида железа модифицированные полимерами привлекают к себе большое внимание из-за широкого применения в одной из ведущих областей науки – наномедицине. Существует два подхода к синтезу НЧ покрытых полимерной оболочкой [101]. Первый поход заключается в стабилизации НЧ различными полимерами *in situ*, то есть во время синтеза НЧ. Второй способ стабилизации поверхности состоит из двух последовательных этапов: 1) синтез НЧ и 2) покрытие поверхности НЧ полимером [102]. В литературе наиболее распространенными покрытиями являются декстран, карбоксиметилированный декстран, карбоксидекстран, крахмал, арабиногалактан, сульфированный гликозаминогликан, стиролдивинилбензол, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС), полоксамеры и полиоксамины [103,104].

#### Декстран

Декстран представляет собой полимер а-D-глюкозы, построенный из разветвленных цепей различной длины. Данный полисахарид является биосовместимым биодеградируемым веществом, И что является положительным вопроса обеспечения моментом с точки зрения нетоксичности НЧ.

Molday и Mackenzie были первыми, кто сообщил о стабилизации поверхности НЧ декстраном Т-40 [5]. Синтез заключался в соосаждении хлоридов железа (II) и (III) в растворе, содержащем данный полисахарид. Во время нуклеации частиц оксида железа, декстран прочно фиксировался на поверхности за счет большого количества водородных связей, выступая в качестве стабилизатора. Полученное покрытие можно модифицировать различными белками путем его активации с помощью предварительного цепей NaIO<sub>4</sub> окисления полисахаридных с образованием активных альдегидных групп, которые могут активно взаимодействовать с аминогруппами, входящими в состав белка, с последующим восстановлением получаемого конъюгата боргидридом натрия.

Особо важным фактором при выборе декстрана является его длина, которая обеспечивает оптимальные полярные взаимодействия (за счет координационных и водородных связей) с поверхностью НЧ оксида железа. Jung рассмотрел модель адсорбции полимера на поверхности НЧ, где взаимодействия происходят за счет активных функциональных групп макромолекулы [105]. Однако, быть молекулы декстрана могут десорбированы с поверхности оксида железа нагреванием при 120 °С или разбавлением [106]. Для того, чтобы избежать десорбции декстрана с поверхности НЧ оксида железа его полисахаридные цепи поперечно сшивают эпихлоргидрином [107,108], благодаря чему декстран становится водонерастворимым, но при этом сохраняет свои гидрофильные свойства.

Вautista и др. [106] описали способ получения СПМ НЧ методом лазерного пиролиза и соосаждения, с последующей модификацией поверхности НЧ декстарном. Физико-химическими методами анализа был определен механизм адсорбции декстрана. Выявлено, что адсорбции декстрана на поверхности НЧ маггемита, полученных лазерным пиролизом, связана с образованием более прочных водородных связей между гидроксильными группами декстрана и поверхностью частиц оксида железа.

В работе [61] использовали производные силана для функционализации НЧ оксида железа. Авторам удалось разработать оригинальный синтетический способ получения сверхмалых суперпарамагнитных НЧ оксида железа по многоступенчатой процедуре, состоящей из синтеза маггемита, модификации его поверхности аминопропилсилановыми группами с образованием сложноэфирной связи с декстраном, и последующим восстановлением оснавания Шиффа до вторичного амина.

Стоит отметить, что практически все представленные в настоящий момент на рынке контрастные препараты на основе магнитных НЧ оксида железа, используют именно декстран в качестве биосовместимого стабилизирующего покрытия.

# Полиэтиленгликоль (ПЭГ)

ПЭГ-гидрофильный, водорастворимый, биосовместимый полимер. В настоящее время используется в большом количестве макромолекулярных препаратов для увеличения времени их циркуляции в крови за счет предотвращения процесса неспецифической адсорбции белков и последующего захвата клетками ретикуло-эндотелиальной системы [109,110].

В работе [111] были разработаны различные методы получения стабильных НЧ малых (60-100 нм) и сверхмалых (20-35 нм) размеров, покрытых ПЭГ. Yue-Jian и др. [112] сообщили о простом способе синтеза НЧ оксида железа с ПЭГ-покрытием путем гидролиза FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O в воде с

51

последующей обработкой блок-сополимером поли(этиленгликоль) поли(аспарагиновая кислота). НЧ, покрытые ПЭГ, показали отличную растворимость и стабильность как в водном растворе, так и в физиологическом буфере. Методом ИК-спектроскопии показали, что ПЭГ - полиаспаргиновая кислота связаны с поверхностью НЧ оксида железа за счет координационных связей, образованных между блок-сополимером и Fe<sup>3+</sup> на поверхности НЧ.

В литературе описано большое количество методов покрытия магнитных НЧ оксида железа, в которых в качестве стабилизируещего покрытия используется полиэтиленгликоль, содержащий карбоксильные концевые группы [113], либо его блок-сополимеры с полимерными органическими кислотами, например, полиаспарагиновой кислотой [114].

# Поливиниловый спирт (ПВС)

ПВС - гидрофильный, биосовместимый полимер. Стабилизация поверхности НЧ поливиниловым спиртом предотвращает их агломерацию, приводя к образованию монодисперсных частиц [115,116].

Так, в работе [117] были синтезированы НЧ оксида железа ПВА стабилизированные хорошо известным методом соосаждения. Коллоидная стабильность конечного продукта с полимерным покрытием, а также результирующее распределение частиц по размерам были определены для различных соотношений железо/полимер. На основе полученных результатов была предложена модель механизма стабилизации, и определено соотношение железо/полимер равное 2.

Также известно, что ПВС – это уникальный синтетический полимер, способный превращаться в полимерный гель, который представляет собой особый класс макромолекул с уникальными свойствами. В работе [118] сообщили о синтезе ферромагнитной жидкости на основе полимерного геля ПВС и глутарового альдегида, которая сохраняла свои свойства в течение длительного времени. Затем магнитный гель сушили, получали биосовместимую пленку.

#### Альгинаты

Альгинаты - ионогенные полисахаридные полимеры, производные альгиновой кислоы, с разветвленными связями. Полимер имеет ячеистую структуру, которая определяет прочность и термостабильность вещества. Исследователи предполагают, что электростатическое взаимодействию между карбоксильными группами альгината и поверхностью НЧ повышает стабильность суперпарамагнитных НЧ. За последнее время было разработано несколько способов получения НЧ оксида железа, покрытых альгинатами [119–121].

Стандартный химический 1) синтез состоит ИЗ трех стадий: гелеобразование альгината и ионов железа, 2) осаждение гидроксида железа in situ в щелочной среде с добавлением альгината, 3) окисление гидроксида железа окислителем, таким как O<sub>2</sub> или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Описанный метод очень сложен Ma разработали В исполнении. И др. новый модифицированный двухступенчатый метод соосаждения [122]. Результаты показали, что типичные НЧ оксида железа представляют собой магнетит с диаметром ядра 5-10 нм, а гидродинамический диаметр частиц покрытых альгинатом составляет 193.8-483.2 нм.

Могаles и др. [123] также описали новый метод синтеза магнитных НЧ оксида железа, стабилизированных альгинатом, с контролируемым размером и магнитными свойствами для биомедицинского применения. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что использование полимера в синтезе ограничивает размер частиц. Средние размеры НЧ оксида железа составили от 4.3 до 9.5 нм.

#### Хитозан

Хитозан - природный, нетоксичный, гидрофильный, биосовместимый и биоразлагаемый полимер. В настоящее время представляет большой интерес для использования в бионаномедицине [124]. Он построен из остатков D-глюкозамина и N-ацети-D-глюкозамина и является, таким образом, слабым основанием – это определяет его привлекательность для связывания отрицательно заряженных молекул на поверхности частиц.

Пример использования хитозана для покрытия магнитных наночастиц оксида железа был продемонстрирован в работе [125]. Для связывания с поверхностью молекулы были хитозана частиц полисахарида модифицированы производными дофамина, которые способны эффективно вступать в реакцию обмена лигандов с олеиновой кислотой, являющейся стабилизирующим агентом В процессе синтеза частиц. Полученные наночастицы легко диспергировались в воде и демонстрировали высокую коллоидную стабильность, что говорит о перспективности такого подхода к покрытию частиц.

Микросферы, состоящие из СПМ НЧ оксида железа и хитозана, были разработаны как новый эмболический материал, детектируемый с помощью МРТ. Lee и др.[126] получили сферические НЧ (НЧ<sub>сф</sub>) радиусом около 15 нм сонохимическим методом синтеза и внедрили их в хитозан. Микросферы показали увеличение контраста в МР-изображениях, в экспериментах *in vitro*.

# Другие полимерные покрытия

Кроме вышеперечисленных, для покрытия магнитных наночастиц оксида железа может быть использовано большое количество синтетических полимерных покрытий, таких как, полиметакриловая кислота, поливинилпирролидон, полицианакрилат, поли(є-капролактон), арабиногалактан и другие [127]. Их преимуществом является возможность задавать химические свойства поверхности частиц, однако для многих из них нет достаточных данных о биосовместимости и биодеградируемости, что усложняет внедрение конечного препарата в клиническую практику.

Например, НЧ оксида железа, покрытые арабиногалактаном, распознаются асиалогликопротеиновыми рецепторами, присутствующими в нормальных гепатоцитах [128,129]. Покрытия из полиакриловой кислоты повышают стабильность и биосовместимость частиц, а также способствуют биоадгезии [117].

СПМ НЧ оксида железа также могут быть покрыты полиэтиленимином (ПЭИ)[131,132]. ПЭИ как известно, образует катионные комплексы с ДНК (полиплексы), которые неспецифически взаимодействуют с отрицательно клеточной заряженной поверхностью мембраны,что приводит к проникновению ДНК в клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза [133]. В работе [127] было показано, что маггемит может быть стабилизирован полимерной оболочкой в два этапа. Первый этап модификация поверхности НЧ ПЭИ, а второй – модификация поверхности поли (этиленоксид) -блокполи (глутаминовой кислотой). Гидродинамический диаметр НЧ увеличивался ступенчато от 25 нм до 46 нм, что связано со стабилизацией поверхости. Было установлено, что покрытые НЧ маггемита устойчивы в воде и физиологическом водном растворе. Эксперименты in vivo на живых крысах показали, что модифицированные НЧ проявили себя наилучшим образом для применения в качестве контрастного агента для МРТ.

Okassa и др. [134] разработали биоразлагаемые и биосовместимые наноплатформы поли (лактид-ко-гликолида) субмикронного размера, наполненные НЧ магнетита, для таргетной доставки лекарственных препаратов. НЧ магнетит/ПЛГА были получены методом модифицированной двойной эмульсии (B/M/B) или методом испарения эмульсии (M/B)[135]. Микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии ПЭМ показали, что были получены НЧ с диаметром магнитного ядра от 5 до 15 нм, внедренные внутрь полимера и равномерно диспергированые в частицах ПЛГА.

#### Биомолекулы

Одним из наиболее привлекательных типов покрытий для магнитных НЧ оксида железа являются биомолекулы (ферменты, антитела, белки, биотин, человеческий/бычий альбумин, авидин, полипептиды и др.) – они являются абсолютно биосовместимыми и биодеградируемыми молекулами благодаря своей эндогенности, а также часто обладают гидрофильностью и большим зарядом поверхности [136], что является положительным моментом в обеспечении коллоидной стабильности НЧ.

Иммобилизация белка на поверхности оксида железа может быть осуществлена с помощью следующих методов [137]: 1) ковалентная конъюгация со стабилизирующими молекулами, введенными на этапе синтеза частиц; 2) осаждение на поверхности с помощью высаливания молекул белка; 3) обратимое связывание на поверхности за счет электростатических или гидрофобных взаимодействий; 4) аэрозольная сушка.

Кроме того, из-за большого разнообразия, как карбоксильных, так и гидроксильных групп водящих в состав биомолекул, НЧ могут быть довольно легко конъюгированы с большинством таргетных молекул.

Чаще всего модификация поверхности НЧ биомолекулами происходит по методу «зеленого» синтеза. Этот метод заключается в смешивании солей железосодержащих прекурсоров с «зеленым» субстратом, содержащим биологические соединения (Рисунок 26).



Рисунок 26 – Наглядная схема стабилизации поверхности НЧ методом «зеленого» синтеза

Например, Wu и др. [138] методом соосаждения получили HЧ оксида железа со средним размером 20 нм, используя глюкозу в качестве стабилизатора. Полученный материал применяли в гипертермии. Еще одним соединением, используемым в качестве стабилизатора для магнитных HЧ является наноцеллюлоза, выделенная из алоэ вера. Данное покрытие дополнительно проявляет антибактериальную активность и позволяет получать HЧ со средним размером 15-30 нм [139]

В работе [140] оказалось возможным одновременно провести модификацию поверхности НЧ эндогенными белками: бычьим сывороточным альбумином (БСА) и человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), путем реакции обмена лигандов. Модификация поверхности НЧ была дополнена данными ИК-спектроскопии. Полученные НЧ продемонстрировали высокую стабильность в течении 6 месяцев, белковое покрытие позволило добиться снижения цитотоксичности системы.

Часто для модификации поверхности наночастиц используют такие биомолекулы, как трансферин [141,142] инсулин [143], альбумин [144].

#### Стабилизация поверхности мономерными покрытиями

Функциональные группы, включающие карбоксилаты, фосфаты и сульфаты, как известно, связываются с поверхностью магнетита [145][146][147].

### Карбоксилаты

Поверхность НЧ магнетита может быть стабилизирована молекулами органических кислот, например лимонной кислоты [148]. Лимонная кислота может координировать с поверхностью оксида железа за счет нескольких карбоксильных групп, входящих в ее состав. При этом группы, не взаимодействующие непосредственно с поверхностью частицы, остаются доступными растворителю, что обеспечивает наличие отрицательного заряда на поверхности таких частиц при физиологических pH, и придает гидрофильные свойства частицам.

VSOP C184 - это частицы оксида железа, стабилизированные мономерным покрытием (лимонной кислотой), проходящие клинические испытания [149]. Эти частицы, полученные оптимизированным методом соосаждения в присутствии избытка цитрат ионов, характеризуются диаметром магнитного ядра 4 нм и гидродинамическим диаметром 8,6 нм. Карбоксилаты оказывают важное влияние на рост НЧ оксида железа и их магнитные свойства. Были проведены исследования по влиянию цитрат ионов на размер частиц маггемита [150]. Rose и White изучили влияние цитрат ионов на кинетику окисления  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}[151]$ . В работе [152] показали, что константа скорости, определяющая окисление  $Fe^{2+}$  в присутствии неорганических лигандов, уменьшается в последовательности перхлорат> фторид> нитрат> хлорид> карбонат> сульфат> силикат> и до фосфат аниона, соответственно. Также повышение концентрации лимонной кислоты приводит к значительному снижению кристалличности образующихся

оксидов железа, кроме того, присутствие цитрат ионов приводило к изменению геометрии поверхности. Исследования других научных групп показывают аналогичные результаты [153]. Другие мономолекулярные покрытия, такие как глюконовая кислота [154], димеркаптоянтарная кислота [155] и фосфорилхолин [156], могут быть использованы для стабилизации оксида железа в воде. Диапазон стабильности сильно зависит от рН и концентрации адсорбированных кислот или фосфонатов.

В работах [157-159] сообщают о существовании фазовых диаграмм (осмотическое давление, как функция объемной доли частиц) для НЧ покрытых цитратом. Поведение этих частиц исследуется путем изменения ионной силы, объемной доли или осмотического давления. Структура коллоидной суспензии определяется по измерениям малоуглового рассеяния нейтронов. Они демонстрируют, характер фазовой что диаграммы контролируется соотношением взаимодействий притяжения/отталкивания также, как и для коллоидных суспензий. Если отталкивание преобладает, существуют только жидко-твердые фазы. Если притяжение доминирует, получается фазовая диаграмма с газовой, жидкой и твердой фазами, как в атомных системах. Такие же эксперименты проводились и в магнитном поле.

# Фосфаты

В качестве альтернативы карбоксилатам, также используются в качестве стабилизирующего покрытия органические фосфаты, которые могут прочно взаимодействовать с поверхностью оксида железа. Ряд исследователей изучили возможность использования ПАВ алкансульфоновой и алканфосфоновой кислот в качестве эффективных связывающих лигандов на поверхности НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [160–162].

В работе [162] предложили две возможные схемы связывания фосфонатных ионов с Fe<sup>3+</sup>. Данные ИК - спектроскопии показали, что фосфонат ионы образуют бидентантные комплексы с атомами железа на поверхности НЧ оксида железа. Sahoo и др. [160] сообщили о поверхностной дериватизации магнетита олеиновой кислотой, лауриновой кислотой, додецилфосфоновой кислотой, гексадецилфосфоновой кислотой И дигексадецилфосфатом. Исследования показали, что алкилфосфонаты и фосфаты могут быть использованы для получения термодинамически стабильных ферритов. При этом исследование температуры и энтальпии десорбции покрытия позволило предположить, что данные молекулы образуют на поверхности частиц структуру квази-бислоя, В виде напоминающего структуру липосом.

В работе [163] были получены НЧ магнетита методом соосаждения  $Fe^{2+}$ и  $Fe^{3+}$  в присутствии высокогидрофильного поли(винилспиртофосфата) (ПВСП). Было изучено влияние концентрации полимера на размер НЧ, гранулометрический состав, коллоидную стабильность и магнитные свойства. Полученная водная суспензия магнетита, приготовленная с использованием 1% ПВСП, стабильна в течение 4 недель при pH=5-8. Результаты ПЭМ подтвердили наличие хорошо диспергированных кубических часиц магнетита размером около 5.8 нм. Метод динамического светорассеяния показал узкое распределение НЧ по размерам. Зарегистрированные ИК-спектры образцов показали сильный сдвиг валентных колебаний связи Fe-O-P.

Стабилизация поверхности НЧ фосфатными или фосфонатными лигандами делает их биосовместимыми, что дает возможность использования таких НЧ как в МРТ – диагностике, так и для использования в бионаномедицине.

## Производные пирокатехина

Еще одним из широко использующихся классов органических веществ, способных прочно координироваться на поверхности оксидов железа являются производные двухатомного ароматического спирта пирокатехина [164]. С помощью использования соответствующих производных на

60

поверхность частиц могут быть введены карбоксильные, аминные и другие заряженные функциональные группы. Покрытие пирокатехинами обычно осуществляется за счет реакции обмена со стабилизирующими агентами, адсорбирующимися на поверхности частиц в ходе их получения [165].

На настоящий момент наиболее распространенным производным пирокатехина, использующимся для покрытия частиц оксида железа, является незамещенный дофамин, использование его может приводить к зрения биомедицинских неудовлетворительным результатам С точки применений. Это связано с тем, что дофамин склонен диссоциировать с поверхности частиц при физиологических рН, и может окисляться в присутствии ионов Fe<sup>3+</sup>.



Рисунок 27 – Схематическое изображение 4-нитродофамина, иммобилизованного на поверхности частицы оксида железа

Для решения проблемы в литературе этой были предложены модифицированные производные дофамина, обладающие большим потенциалом окисления. Например, в работе [166] для осуществления прочного, устойчивого покрытия частиц оксида железа был использован 4нитродофамин (Рисунок 27). В работе [164] было показано, что различные катехоловые лиганды могут быть одновременно присоединены к НЧ оксида воспроизводимо формировать железа, что позволяет легко И многофункциональные наноструктуры. Высокая стабильность НЧ оксида модифицированных нитрокатехоловыми была железа лигандами

продемонстрирована группой Textor [167] для получения НЧ с дендритными полимерными оболочками. Новый класс дендритно стабилизированных НЧ имеет высокий потенциал для использования в бионаномедицине, в которых ключевыми параметрами являются стабильность, устойчивость, обратимая агрегация, сверхмалый размер, и высокая плотность биоактивных лигандов.

# Олеиновая кислота (ОК)

Олеиновая кислота является популярным ПАВ благодаря своей высокой растворимости в органических растворителях (этанол, хлороформ и т.д.) и нетоксичности, помимо этого НЧ, модифицированные ОК, демонстрируют высокую биосовместимость, диспергируемость [168]. Mahdavi и др. [169] обнаружили, что рН, начальная температура и скорость перемешивания являются важными параметрами для получения монодисперсных НЧ покрытых ОК. Zhang и др. [170] указали, что плотность покрытия НЧ олеиновой кислотой может существенно влиять на размер частиц, что в свою очередь влияет на магнитные свойства НЧ оксида железа. Несмотря на то, что ОК малорастворима в воде, НЧ, покрытые ОК, могут быть диспергированы в неорганических растворителях при оптимальном значении рН, что удобно для их практического применения, особенно в области бионаномедицины.

# Стабилизация поверхности неорганическими покрытиями

В качестве оболочки для НЧ оксида железа могут быть выбраны неорганические материалы, такие как кремний [171–173], золото [173,174] или гадолиний[175]. Эти НЧ имеют внутреннее железооксидное ядро с внешней металлической оболочкой из неорганических материалов. Данные покрытия обеспечивают не только стабильность наночастиц в растворе, но и простоту функционализации поверхности НЧ, а также биосовместимость.

62

#### Оксид кремния

Одним из наиболее распространенных неорганических материалов, используемых для покрытия частиц, имеющих биомедицинское применение, является оксид кремния. Данный материал гидрофилен и придает поверхности НЧ отрицательный заряд, что обеспечивает коллоидную стабильность конечной системы. Кроме того, оксид кремния может быть легко модифицирован различными органическими лигандами, в том числе биомолекулами [176].

Были исследованы три различных подхода к стабилизации поверхности НЧ оксида железа оксидом кремния. Первый подход основан на широко известном методе Штобера, заключающемся в контролируемом гидролизе тэтраэтил ортосиликата (ТЭОС) [177]. Например, Tumturk и др. [178] получили суперпарамагнитные НЧ оксида железа, покрытые по методу Штобера. Их исследование показало, что конечный размер частиц зависит от концентрации НЧ оксида железа и типа растворителя.

В качестве альтернативного второго способа в литературе было предложено осаждение оксида железа (III) из насыщенных растворов кремниевой кислоты [179]. Различные исследования доказали, что метод кремниевой кислоты, по-видимому, более эффективен чем метод Штобера. Он очень прост в исполнении, а размер частиц можно регулировать от десятков до нескольких сотен нанометров, изменяя соотношение SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Третий подход - это эмульсионный метод получения НЧ, покрытых кремниевой оболочкой, при котором используются прямые и обратные мицеллы для контроля толщины формируемого кремниего слоя. Данный подход требует больших усилий для отделения НЧ типа «ядро оболочка» от большого количества ПАВ, который стабилизирует эмульсию [127].

Одним из преимуществ покрытия на основе оксида кремния является наличие поверхностных силановых групп, которые могут легко реагировать с

различными связующими агентами для ковалентного присоединения специфических лигандов к поверхности магнитных НЧ [180]. Например, аминные группы на поверхности НЧ магнетита могут быть введены путем гидролиза и конденсации кремнийорганических соединений таких как аминопропилтриэтоксисилан [181].

#### Золото

Перспективным методом стабилизации магнитных наночастиц оксида железа является покрытие их тонкими оболочками инертных металлов – прежде всего золота. Золото - еще одно неорганическое покрытие, которое используется для реализации функциональных возможностей магнитных НЧ, а также для повышения их стабильности в водных дисперсиях. В литературе существует несколько протоколов получения магнитных наночастиц покрытых золотой оболочкой. Например, Lin и др. [88] синтезировали НЧ Fe@Au со структурой «ядро-оболочка» методом обратной мицеллы. Водорастворимые НЧ оксида железа, покрытые Au-оболочкой размером около 60 нм, были получены путем восстановления Au<sup>III</sup> на поверхности НЧ в присутствии гидроксиламина.

В качестве примера использования такого покрытия может быть приведена работа [182], в которой синтез НЧ оксида железа и покрытие оболочкой золота осуществлялось в два этапа в микроэмульсиях. В качестве прекурсора золота в данной работе использовалась HAuCl<sub>4</sub>, а восстановителем выступал NaBH<sub>4</sub>

НЧ золота находят широкое применение В биомедицинских исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Благодаря этому, в литературе имеется достаточно много данных, подтверждающих ИХ нетоксичность. Дополнительным преимуществом покрытия золотом является то, что оно может быть легко модифицировано с помощью доступных серосодержащих

органических веществ, что определяет потенциал их модификации активными биомолекулами [183].

#### Серебро

Серебро – еще один благородный металл, используемый для стабилизации поверхности НЧ [184]. Эксперименты *in vivo* Gao и др. на мышах показали, что гибридные НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag являются эффективными контрастными агентами для компьютерной томографии (КТ) [185].

С другой стороны, магнитные нанокомпозиты с серебряным покрытием также считаются перспективными многофункциональными материалами, поскольку обладают уникальными антибактериальными свойствами [186]. Гибридные  $Fe_3O_4(a)C(a)Ag$  являются доминирующим классом наноматериалов, благодаря их широкому применению в различных областях исследований [187–189]. Xia и др. синтезировали НЧ Fe3O4@C@Ag и сделали вывод, что при введении углеродного слоя их синтезированные НЧ обладают лучшей антибактериальной активностью по сравнению с Fe3O4@Ag. Таким образом, гибридные НЧ Fe3O4@C@Ag могут быть использованы в качестве антибактериальных адсорбентов катализаторов, средств, И бифункциональных магнитооптических зондов [190]. Chen и др. сообщают о разработке многофункциональной системы на основе гибридных НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C@Ag. Что еще более важно, НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C@Ag обеспечивают изображений методом флуоресцентной микроскопии с визуализацию двухфотонным возбуждением и при помощи МРТ [191].

# Углерод

Углерод, благодаря своим свойствам, таким как высокая химическая и термическая устойчивость в совокупности с высокой биосовместимостью, в последнее время привлекает все больше внимания [192]. Покрытия из графитоподобного углерода обеспечивают защитный барьер НЧ от окисления и разрушения кислотами. В работе [193] удалось получить НЧ Со@С, которые, благодаря своей структуре, могут быть использованы В качестве флуоресцентных агентов, а также в качестве агентов для гипертермии. Кроме того, модифицированные углеродом НЧ часто находятся в металлическом состоянии и имеют больший магнитный момент, чем соответствующие оксиды. Стоит отметить, что НЧ покрытые углеродом гидрофобны, поэтому необходима модификация поверхности. Часто поверхность Fe3O4@C функционализируют аминогруппами, что повышает реакционную способность и гидрофильность частиц, но магнитные свойства при этом сохраняются [194].

Стабилизация поверхности НЧ железа углеродом препятствует свободно-радикальным процессам и исключает реализацию повреждения молекул и клеток через оксидативный стресс [195]. НЧ оксида железа, покрытые углеродом, можно использовать для адсорбции токсинов, антибиотиков, патогенов [196]. Помимо этого, НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@С применяются для адресной доставки лекарств и в МРТ-диагностике [197-199]. Например, Chen и др. [200] сообщили о синтезе НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> покрытых аминодекстраном и оксидом графена (ГО). Исследование in vivo показало, что интернализация НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ГО не влияет на жизнеспособность и пролиферацию клеток, и по сравнению с голыми Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ГО значительно увеличивают интенсивности сигнала в Т2-взвешенном изображении.

#### Металл оксиды и сульфиды

Все больше и больше оксидов и сульфидов металлов используется для стабилизации и функционализации НЧ благодаря своим уникальным физикохимическим свойствам. Выделяют шесть основных групп оксидов металлов такие как  $M_2O$  (Cu<sub>2</sub>O, Ag<sub>2</sub>O и т.д.), MO (ZnO, MgO, CoO, ZnS, CdS и т.д.),  $Mn_2O_3$  (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и т.д.) MO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub>,SnO<sub>2</sub> и т.д.),  $M_2O_5$  (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и т.д.) и

66

MO<sub>3</sub> (WO<sub>3</sub>, MoO<sub>3</sub> и т.д.) [101], и сульфиды металлов, например, CdS [201–203], ZnS [204,205], PbS [206], Bi<sub>2</sub>S [207] и.т.д.

Например, Хи и др. [208] синтезировали высокобиосовместимые суперпарамагнитные ΗЧ люминисцентные Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> функционализировали кремниевой оболочкой SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>) путем тиольной сшивки были конъюгированы с водорастворимыми CdSe-ZnS квантовыми точками (КвТ). Эти частицы были успешно использованы для индукции апоптоза в раковых клетках поджелудочной железы с помощью радиочастотного электромагнитного излучения. Wang и др. представили очень простую стратегию синтеза суперпарамагнитных флуоресцентных полых наносфер Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZnS путем процесса созревания Оствальда. Эти полые наносферы с высокопористой оболочкой, диаметром менее 100 нм не только нетоксичны, но и обладают очень хорошим магнитным моментом и люминисцентыми свойствами [209], которые могут быть полезны В бионаномедицине.

оболочкой, Магнитные материалы, покрытые металлической оказывают значительное влияние на конечные магнитные свойства [210] Со<sub>3</sub>О<sub>4</sub> [211,212], NiO [213], Мл<sub>х</sub>О<sub>v</sub> [214,215], СоFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, МлFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> и др. Сочетание двух различных магнитных фаз создаст новые магнитные НМ для применения в бионаномедицине. Liu и др. разработали синтез магнитных многофункциональных гетеро НЧ (обозначенных как Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NiO и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), используя сольватермический метод. Полученные гетеро НЧ обладали рядом важных характеристик, таких как контролируемая толщина оболочки, большая площадь поверхности, высокие магнитные свойства при комнатной температуре. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NiO может быть применен для магнитной сепарации His-меченых белков от клеточного лизата и пептидов с различной молекулярной массой из сложных систем для проведения массспектрометрического исследования [216].

#### Магнитные свойства наночастиц

В последнее десятилетие магнитные НЧ были исследованы с точки зрения их магнитных свойств [156]. НЧ на основе феррита, в частности металлические НЧ, такие как оксид железа, благодаря их простоте получения и возможности контролировать их магнитные свойства, в частности намагниченность. Парамагнитные свойства, которыми обладают магнитные НЧ оксида железа, являются их главной уникальной отличительной чертой, что позволяет использовать их в качестве эффективных агентов для МРТ. НЧ способны генерировать собственное локальное магнитное поле и выступать в качестве контрастного агента для МРТ, при этом уменьшать время T<sub>2</sub> релаксации протонов и интенсивность сигнала от анализируемой ткани [217].

На магнитные свойства НЧ влияют многие факторы, среди которых можно выделить такие как размер, форма, морфология (для частиц с комплексной структурой), химический состав, тип кристаллической решетки и степень ее дефектности. Управлять магнитными свойствами магнитных материалов можно, изменяя форму размер и состав. Не стоит забывать, что эффективность материалов также будет зависеть от однородности их химических и физических свойств.

В последующих разделах рассмотрим влияние размера, формы, состава и поверхностной модификации НЧ на магнитные свойства и какие параметры следует оптимизировать, чтобы их улучшить.

# Влияние размера НЧ на магнитные свойства

Наиболее спорным вопросом в области магнитных НЧ является изменение намагниченности насыщения (M<sub>S</sub>) в НЧ оксида железа в зависимости от размера синтезируемых частиц. Независимо от способа получения намагниченность насыщения уменьшается с уменьшением размера НЧ (Рисунок 28). Уменьшение значения намагниченности для НЧ оксида железа происходит за счет случайного наклона спинов, находящихся в

поверхностном слое и конкурирующих антиферромагнитных взаимодействий [218]. В последнее время теоретические расчеты и экспериментальные данные указывают, что источником явления, описанного выше, все-таки является беспорядочное поведение поверхностных спинов [219,220]. Этот эффект экспериментально наблюдается в γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> и CrO<sub>2</sub> [221,222].



Рисунок 28 – Кривая намагниченности в зависимости от приложенного поля, как функция размера частиц маггемита. Отчетливо наблюдается увеличение намагниченности в зависимости от размера частиц

Также известно, что намагниченность насыщения наноразмерных металлических частиц меньше, чем у объемных материалов. В работе [223] были получены НЧ никеля с размером ядра 15-18 нм, у которых намагниченность насыщения меньше, чем у объемного никеля. Усиление намагниченности также наблюдается у НЧ Fe, Co и Ni с размерами менее 2 нм (кластеры) и необычно большая коэрцитивность при низкой температуре [224]. Такая особенность НЧ может объясняться наличием особого поверхностного слоя НЧ, при котором спины разупорядочены и не участвуют в намагничивании [223]. Однако, когда происходит окисление поверхности металла, наблюдается уменьшение намагниченности с уменьшением размера

НЧ	Размер, нм	Ms (А·м²/кг)	Н (А/м)	$T_{B}\left(K ight)_{u \pi u} T_{N}\left(K ight)$
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [227]	4.2	75	$318 \cdot 10^8$	19
	7.4	70	$270 \cdot 10^{8}$	28
	8.1	65	$70.10^{8}$	49
	17	82	$364 \cdot 10^{8}$	>275
	45	92	$340.10^{8}$	>275
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [228]	4.9	60.4		33.9
	6.3	64.8		56.2
	8.6	58.0		96.0
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [228]	4.2	30.6		89.4
	4.8	46.0		149.2
	18.6	48.8		286.4
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [228]	9.3	57.1		397.7
	11.7	54.6		91.0
	59.5	35.2		96.6
Ni [229]	24	25.3	$120.10^{8}$	
	50	32.3	79·10 <sup>8</sup>	
	96	40.6	$18.10^{8}$	
	165	46.7	$146 \cdot 10^8$	
	200	52.0	$158 \cdot 10^8$	
Zn <sub>0.4</sub> Fe <sub>2.6</sub> O <sub>4</sub> [230]	18	165	$60.10^{8}$	320
	60	190	$140.10^{8}$	
	120	200	60	

Таблица 3— Зависимость магнитных свойств от размера НЧ

Ms-намагниченность насыщения; H-коэрцитивная сила;  $T_B$ - температура блокировки;  $T_N$ -Температура Нееля.

Анализируя данные, приведенные в таблице, можно сделать вывод о том, что, варьируя размер НЧ, можно варьировать и магнитные свойства НЧ, в зависимости от их конечного целевого применения.



Рисунок 29 – Переход от суперпарамагнитного состояния к однодоменному и многодоменному состоянию [231]

Наглядно мы можем видеть, как размер НЧ может определить ее магнитное состояние (Рисунок 29). По мере уменьшения размера НЧ энергия магнитной анизотропии на НЧ уменьшается. Энергия магнитной анизотропии - это энергия, которая удерживает магнитный момент в определенной ориентации. При определенном размере для каждого типа НЧ энергия анизотропии становится равной тепловой энергии, что допускает случайное изменение магнитного момента [232]. Изменение происходит при размерах ниже Dcr2, тогда ΗЧ считается суперпарамагнитной. Величина И намагниченности насыщения (Ms) также сильно зависит от размера НЧ и (10)[233]. ΗЧ обладают описывается уравнением Магнитные неупорядоченной ориентацией спинов на своей поверхности, и когда размер НЧ мал (<5 нм), отношение неупорядоченного слоя к радиусу НЧ высоко. Таким образом наблюдается беспорядочное поведение поверхностных

спинов, приводящее к уменьшению Ms для более мелких HЧ, и определяется по формуле:

$$Ms = Ms_b[(r-d)/r]^3$$
 (10),

где где r - радиус, d-толщина поверхности магнитных HЧ, а Ms<sub>b</sub> - объем Ms. Недавние исследования показали, что функционализация поверхности магнитных НЧ может снизить уровень поверхностного спинового беспорядка, наблюдаемого в НЧ малого размера, тем самым увеличивая намагниченность насыщения Ms [234,235]. Guardia и др. сравнили магнитные свойства НЧ оксида железа (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) диаметром 6, 10 и 17 нм и обнаружили, что Ms каждого из них неожиданно достиг объемного значения. Это происходит за счет ковалентной модификации поверхности НЧ молекулами олеиновой кислоты, что приводит к уменьшению поверхностного спинового беспорядка, и, следовательно, увеличению Ms. Однако Nagesha и др. не наблюдали такого явления, когда исследовали 10 нм НЧ оксида железа (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), которые были стабилизированы дофамином и олеиновой кислотой. Авторы наблюдали улучшение магнитных свойств после стабилизации поверхноси НЧ дофамином, так как Ms и температура блокировки (Тв) увеличились с 38 А·м<sup>2</sup>/кг и 30 К для НЧ функционализированных олеиновой кислотой до 60 А·м<sup>2</sup>/кг и 50 К для для НЧ функционализированных дофамином.

НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> находятся в центре внимания исследователей, оценивающие влияние различных параметров НЧ на магнитные свойства, благодаря легкому способу получения И высокому потенциалу использования ИХ В бионаномедицине [29,62]. Существуют также значительные исследования, касающиеся других типов НЧ, применяемых для других целей. Таблица 3 объединяет исследования, в которых оценивалось влияние размера на магнитные свойства различных типов магнитных НЧ. В большинстве исследований, значение Ms увеличивается с размером НЧ, пока не достигает максимума, близкого к значению объемной намагниченности; эта тенденция,
по-видимому, не зависит от метода синтеза НЧ. Три независимых исследования, трех научных групп, используя различные методы синтеза НЧ, показали, что размер НЧ влияет на магнитные свойства НЧ магнетита [227,236,237]. Кроме того, в большинстве исследований влияние размера НЧ на коэрцитивную силу аналогично, но после достижения максимума коэрцитивная сила уменьшается с увеличением размера. Последнее явление происходит потому, что по мере увеличения размера, магнитные НЧ становятся однодоменными, а затем многодоменными структурами, в которых магнитный момент каждого домена может быть не ориентирован в одном направлении. При приложении внешнего магнитного поля магнитный момент ориентируется по направлению внешнего магнитного поля, направленный вдоль направления магнитного поля, но если приложить некоторое обратное по направлению поле, это приведет к снижению коэрцитивной силы, и остаточной намагниченности к нулю. В своем научном исследовании Guardia и др. сообщили об одном из самых высоких значений Ms (Таблица 3) наблюдаемых в диапазоне размеров от 7,4 нм до 45 нм для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, но объяснения своим значениям не дали [227]. Аналогичные результаты были получены и в случае НЧ Ni [229]. Анализируя значения коэрцитивной силы в работе [227] магнитные НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> размеры ядра которых выше 17 нм являются многодоменными [238]. Данный вывод можно также сделать, опираясь на Рисунок 30. Независимо от состава НЧ, влияние размера НЧ на магнитные свойства постоянно. Это явление было продемонстрировано Demortier и др., которые изучали магнитное поведение структуры НЧ Fe<sub>2.66</sub>O<sub>4</sub>, и наблюдали, что намагниченность насыщения увеличилась с 29 А·м<sup>2</sup>/кг до 77 А·м<sup>2</sup>/кг, а температура блокировки увеличилась с 10 К до 100 К по мере увеличения размера наночастиц с 2,5 нм до 14 нм [239].



Рисунок 30 – Влияние размера на поведение магнитных наноматериалов

Одним из методов терапии опухолей является магнитная гипертермия. Применение метода основано на том, что при воздействии внешних переменных магнитных полей в условиях *in vivo* наблюдается селективная гибель опухолевых клеток при температуре 40-44 °С. Размер НЧ в данном случае является критическим, поскольку применение переменного магнитного поля приводит к нагреву, возникающему в результате неелевской релаксация, броуновской релаксации, или гистерезисных потерь. В переменном магнитном поле либо происходит изменение ориентации магнитного момента, но сама частица не изменяет свою ориентацию (Неелевская релаксация, со временем релаксации  $\tau_N$ ), либо происходят тепловые флуктуации, которые приводят к случайному перевороту НЧ вместе с магнитными моментами (Броуновская релаксация, со временем релаксации  $\tau_{B}$ ) и, когда НЧ возвращаются В свое первоначальное состояние, выделяется тепло. Эффективность нагрева магнитного материала описывается удельным коэффициентом поглощения (SAR), который равен скорости поглощения энергии на единицу массы НЧ при определенной частоте [240] и описывается уравнением (11). Поскольку генерация и поглощение тепла возникают в результате процессов, связанных с релаксационными и гистерезисными потерями, оно также описывается как "удельная мощность потерь" (SLP) и определяется как:

SAR(или SLP), 
$$W/g = C(\Delta T/\Delta t)$$
 (11),  
= (Площадь петли гистерезиса) × (частоту, f)

где С – удельная теплоемкость воды,  $\Delta T / \Delta t$  - это скорость изменения температуры. Значения SAR/SLP, возникающие в результате релаксационных процессов, примерно пропорциональны Ms и константе магнитокристаллической анизотропии (K) и обратно пропорциональны распределению НЧ по размерам [241].

Mornet и др. показали, что на SAR НЧ влияет состав НЧ, диаметр, покрытие и частота переменного магнитного поля [61]. При повышении размера магнитных НЧ нагрев происходит уже за счет гистерезисных потерь броуновской релаксации. Для малых НЧ в однодоменном или И суперпарамагнитном состоянии гистерезисные потери пренебрежимо малы или отсутствуют, а нагрев возникает в результате неелевской и броуновской релаксации. Определить степень вклада конкретного механизма трудно, но доминирующий механизм может быть выявлен путем определения более быстрого времени релаксации [235]. В целом, неелевская релаксация доминирует, когда размер НЧ меньше 20 нм, и броуновская релаксация доминирует, когда размер НЧ больше 20 нм [242]. Fortin и др. провели исследование, чтобы внести ясность в различие вкладов между неелевской и броуновской релаксациями и их влияние на SAR (или SLP) [243], что также подробно будет обсуждаться ниже. Интересное и полезное исследование было проведено Jeun и др. и был установлен пороговый размер НЧ (~9.8 нм), ниже которого измеренная SLP недостаточна для применения при гипертермии [244]. Они оценили вклад НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> размером от 4.2 нм до 22.5 нм и определили, что SLP был незначительным (<45 Вт/г) при размерах <9.8 нм, но показал результаты SLP на порядок выше в диапазоне размеров от 11.8 до 22.5 нм. Lartigue и др., также наблюдали за влиянием размера НЧ (7 нм) на SLP, и был сделан вывод, что при использовании НЧ меньшего размера нагрева не

происходит [245]. В статье [246] исследовали НЧ диаметром 5 нм, 10 нм, 12.8 нм и 14 нм при частоте магнитного поля 400 кГц и амплитуде 24,5 кА/м. НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> размером 14 нм показали максимальный SLP 447 Вт/г. Все исследования, полученные ранее, очень важны, так как для эффективной гипертермии с минимальной дозой НЧ в организме нужно высокое значение SLP. Ниже (Таблица 4) приводится краткое описание исследований, в которых предпринимались попытки соотнести размер НЧ с SLP. Совсем недавно ученые представили и подтвердили результаты, в которых SLP прямо пропорциональна амплитуде переменного тока для НЧ размером от 5-600 нм, однако не было представлено никакой зависимости от намагниченности насыщения (Ms) [247].

НЧ	Размер, нм	SAR/SLP	Частота/амплитуда	
		(Вт/г)		
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -декстран	10-12	210	880 кГц и 7.2 кА/м	
[61]		210		
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	6-12		880 кГц и 7.2 кА/м	
карбоксиметил		90		
декстран [61]				
Мультидоменные	150-200	45	880 r Eu 11 7 2 r A /M	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [61]	150-200			
Однодоменные	8	21	300  kCu   k 6.5  k  /  M	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [61]	0	21	500 KI II U 0.5 KA/M	
Однодоменные ү-	5	524	500 кГи и 12 5 кА/м	
$Fe_2O_3[61]$	5	524	500 KI L H 12.5 KI U M	
Однодоменные ү-	7	676	500 vFu u 12 5 vA/m	
$Fe_2O_3[61]$	1	020	500 кі ц й 12.5 кл/м	
Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [244]	4.2	45	110 KFII H 11 1 KA/M	
	5.8	30		

Продолжение таблицы 4

	7.9	28	
	9.8	28	
	11.8	150	
	14.0	201	
	16.5	249	
	20.0	309	
	22.5	322	
FerO. [248]	10.9	216	210 KEH H 30 KA/M
10304[240]	15.2	702	210 KI LI U 50 KA/M
γ-Fe <sub>2</sub> Ω <sub>2</sub> [2/3]	5.3	4	700 v [11 14 24 8v A/M
γ-1°C <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [2+3]	6.7	14	700 KI II U 27.0KA/M
	8.0	37	
	10.2	275	
	16.5	1650	
$C_0 E_{0} O_{1} [2/3]$	3.9	40	
C01C2O4 [245]	9.1	360	
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> в 95% H <sub>2</sub> O			
и 5% глицерин	7.1	135	
[243]			
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> в 40% H <sub>2</sub> O			
и 60% глицерин	7.1	125	
[243]			
ү-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> в 0% H <sub>2</sub> O и			
100% глицерин	7.1	100	
[243]			

## Продолжение таблицы 4

СоFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> в 95% H <sub>2</sub> O и 5% глицерин [243]	9.7	420	
СоFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> в 40% H <sub>2</sub> O и 60 % глицерин [243]	9.7	145	
СоFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> в 0 % H <sub>2</sub> O и 100 % глицерин [243]	9.7	90	
	4.1	0	
Fе₂Ω₄-рамноза	6.7	0	
[245]	10.0	30	168 кГц и 21 кА/м
	16.2	61	
	35.2	76	

Чтобы повысить эффективность лечения злокачественных новоборазований гипертермией при помощи магнитных HЧ, Khandhar и др. адаптировали размер HЧ к применяемой частоте [249]. Недавние исследования показали, что SAR/SLP может быть максимизирован, если общее время релаксации соответствует применяемой частоте [250], которая наряду с применяемым полем имеет регулируемый FDA верхний предел [247]. Общее время релаксации - это сумма  $t_N$  и  $t_B$ . Четыре уравнения коррелируют соответствующие факторы:

$$t_N = t_0 e^{(kV/_{kT})}$$
(12)

$$t_B = \frac{3\mu V_B}{K_B T} \tag{13}$$

$$v_N = \frac{1}{(2\pi t_N)}$$
(14)

$$v_B = \frac{1}{(2\pi t_B)}$$
(15)

где t<sub>0</sub> - время релаксации невзаимодействующих магнитных HU (~ $10^{-9}$ - $10^{-12}$  c), К-константа анизотропии, k<sub>B</sub>-постоянная Больцмана, V - объем HU,  $\mu$  - вязкость среды, V<sub>B</sub> - гидродинамический объем, Т - температура, v<sub>N</sub> - частота максимального нагрева за счет t<sub>N</sub> и v<sub>B</sub>-частота максимального нагрева за счет t<sub>B</sub>.

Приведенные уравнения выше показывают, как t<sub>в</sub> напрямую зависит от V<sub>B</sub> и µ и обратно от Т; t<sub>N</sub> изменяется экспоненциально с k<sub>V</sub>. Также можно количественно оценить влияние размера, вязкости суспензионной среды, константы анизотропии И температуры на время релаксации И тепловыделение. Fortin и др. оптимизировали SLP путем настройки времени броуновской И неелевской релаксации изменения путем вязкости суспензионной среды (меньшее время броуновского релаксации для более высокой вязкости), размера и состава НЧ (экспоненциально большее время неелевской релаксации для магнитных НЧ с большим объемом и более высокими константами анизотропии, является функцией состава что магнитных HY) [243]. Магнитные ΗЧ  $CoFe_2O_4$ размером 10 HM продемонстрировали более высокий SLP по сравнению с магнитными НЧ у-Fe2O3 того же размера и, по-видимому, были лучшими кандидатами для применения при гипертермии.

Учитывая, что магнитные свойства НЧ сильно зависят от размера, размер может служить конструктивным параметром, которым можно легко манипулировать для настройки магнитных свойств Ms, коэрцитивной силы, температуры блокировки и SLP для повышения эффективности применения магнитных HЧ. Также стоит помнить, что лишь одно варьирование размера не может дать желаемых результатов.

## Влияние формы НЧ на магнитные свойства

В предыдущем подразделе, значительные усилия были направлены на понимание взаимосвязи между размером НЧ и магнитными свойствами. Очень мало исследований, которые описывают влияние формы на магнитные свойства НЧ, имеющих одинаковый объем или соответствующий параметр размера. Существует множество исследований по синтезу уникальных форм магнитных НЧ: например, нанокубы феррита [74,251], наностержни магемита [252], нанопроволоки NiFe [253], нанодиски кобальта [254,255], тетраподы магнетита [256] и наноцветы Au-MnO [257]. Ниже представлена сводная таблица влияния различных форм НЧ на магнитные свойства (Таблица 5). Таблица 5 – Сравнение магнитных свойств НЧ различной формы

НЧ	Форма НЧ	Размер, нм (по объему)	Мs , А∙м²/кг	Н	<b>T</b> <sub>B</sub> ( <b>K</b> )
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	сферы	10	80	16000 Э	275
[258]	кубы	8 V <sub>сферы</sub> =V <sub>куба</sub>	80	9500 Э	275
v-Fe <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	сферы	14.5	75	30 мТ	235
[259]	кубы	12 V <sub>сферы</sub> =V <sub>куба</sub>	75	30 мТ	190
	кубы	11.8	2.5	164 Э	50
FePt	октаподы	12	2.0	1461 Э	95
[260]	кубоктаэ др	6.8 Vкуба>Vоктапода>Vкубоктаэ дра	0,1	11 Э	20
Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	кубы	8.0	40	0	60
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [261]	сферы	8.5 V <sub>куба</sub> >V <sub>сферы</sub>	31	0	100

Продолжение таблицы 5

	кубы	12	40	0	
	стержни	12	18	4.4	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		12 ширина	10	кА/м	
$(+\gamma-Fe_2O_3)$	сферы	12	80	0	
[262]	Октаэдр	12 <sub>ширина</sub>			
		$V_{{ m kyba}}\!\!>\!\!V_{{ m ctep}{ m жhs}}\!\!>\!\!V_{{ m cdep}{ m b}}\!>$	80	0	
		V <sub>октаэдр</sub>			
Zn <sub>0.4</sub> Fe <sub>2.6</sub> O	сферы	22	145	0	360
4	кубы	18	165	0	320
[230]		$V_{c \phi e p \omega} = V_{\kappa y \delta a}$	105	0	520

Для НЧ СоFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> кубической и сферической формы Song и др. в 2004 году обнаружили разницу только в коэрцитивной силе [258]. Ученые предположили, что такое явление происходит из-за отсутствия на поверхности НЧ координирующих атомов кислорода. В двух исследованиях, в которых сравнивались кубические и сферические магнитные НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Salazar-Alvarez и др. и Zhen и др. наблюдали более высокую температуру блокировки для сферических НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [259,261]. Noh и др. подтвердили наблюдение, описанное выше, высокая температура блокировки также наблюдалась для сферических НЧ Zn<sub>0.4</sub>Fe<sub>2.6</sub>O<sub>4</sub> при сравнении с кубическими НЧ Zn<sub>0.4</sub>Fe<sub>2.6</sub>O<sub>4</sub> [230].

Zhen и др. также было отмечено, что кубические НЧ имеют более высокую Ms по сравнению со сферическими НЧ того же объема [261]. Чтобы объяснить более высокую Ms в кубических НЧ по сравнению со сферическими НЧ того же объема, Noh и др. смоделировали ориентацию магнитных спиновых структур как в кубе, так и в сфере с помощью объектноориентированной программы Micromagnetic Framework (OOMMF) и обнаружили, что для их анализа неупорядоченные спины составляли 4% в кубических НЧ и 8% в сферических MNPs [230]. Основываясь на этом утверждении, более низкие неупорядоченные спиновые вращения в кубах должны привести к более высокому значению Ms для кубических HЧ. Анализируя данные (Таблица 5) сложно провести корреляцию между формой и Ms для HЧ разного объема. Высокая Ms наблюдается для HЧ меньшего объема, однако высокая Ms может наблюдаться для куба большего объема, как описывалось выше, из-за более низких неупорядоченных спинов.

В течение последних двух десятилетий различные магнитные НЧ были оценены на предмет их использования в качестве контрастных агентов для MPT. Принцип работы метода MPT заключается в следующем: при помещении во внешнее постоянное магнитное поле ядра, обладающие собственным магнитным моментом (например, ядра протонов) приобретают два энергетических уровня, соответствующих ориентации магнитного момента по полю и против него (Рисунок 31).



Рисунок 31 – Схема процессов релаксации спинов, происходящих в методе МРТ

Распределение атомов по этим энергетическим уровням подчиняется закону Больцмана, в результате чего суммарный магнитный момент в образце ориентирован по полю. При облучении образца фотонами с энергией, соответствующей разнице между данными уровнями (которая лежит в радиочастотном диапазоне электромагнитного излучения), может происходить его резонансное поглощение с переориентацией магнитного момента атома против поля. При этом интенсивность радиоимпульса может быть подобрана таким образом, чтобы произошла переориентировка вектора суммарной намагниченности в плоскость, поперечную изначальному

90° направлению (так называемый пульс). После этого вектор стремится вернуться намагниченности В изначальное направление, претерпевая два различных процесса релаксации: быструю спин-спиновую релаксацию, заключающуюся в уменьшении поперечной составляющей намагниченности вследствие разфазировки спинов, и спин-решеточную, в ходе которой продольная составляющая нарастает до исходного состояния. В методе МРТ используют регистрацию пространственного распределения характерных времен данных процессов (называемых  $T_2$  и  $T_1$ , соответственно), которые варьируются для различных тканей, благодаря чему возможно анатомической информации высокой получение С точностью. Суперпарамагнитные частицы создают сильные локальные неоднородности магнитного поля, на которых происходит релаксация спинов протонов воды, окружающей частицы – благодаря этому, они изменяют соответствующие характерные повышая контраст на изображении MPT. времена, Суперпарамагнитные частицы наиболее эффективно уменьшают время спинспиновой релаксации, поэтому они, прежде всего, являются негативным Т<sub>2</sub>контрастным агентом [263].

Способность агента увеличивать контраст на МРТ изображении определяется параметром, называемым релаксивностью (r<sub>1</sub>, r<sub>2</sub>) [264,265], и эти параметры коррелируются с помощью уравнения (16). Он отражает коэффициент линейной зависимости между концентрацией препарата в растворе и величиной, обратной времени релаксации, регистрируемой магнитно-резонансным томографом.

$${}^{1}/T_{i} = {}^{1}/T_{i}^{0} + r_{i}C, \quad i = 1,2$$
 (16)

где  $T_1$ ,  $T_2$  - времена продольной и поперечной спиновой релаксации в присутствии наночастиц,  $T_1^0$ ,  $T_2^0$  - времена релаксации в чистой воде,  $r_1$ ,  $r_2$  - константы релаксивности, а C - концентрация НЧ (контрастного агента).

Экспериментально мы можем получить r<sub>i</sub> (i=1,2) из графика зависимости 1/ T<sub>i</sub> (i=1,2) от С. Например, в уравнении (16) r<sub>2</sub> является постоянной величиной, не зависящей от концентрации и имеющей значение, отражающее относительную напряженность магнитного поля, окружающего отдельные НЧ. Для того, чтобы получить усиленный отрицательный контраст необходимо снизить Т<sub>2</sub>, для этого нужно использовать МРТ агент с высоким значением r<sub>2</sub>, либо с более высокой концентрацией. Примерами МРТ агентов с высокими значениями r<sub>2</sub> являются суперпарамагнитные НЧ с высокой (Ms). Для намагниченностью насыщения получения усиленного положительного контраста необходимо снизить значение Т<sub>1</sub>, что требует использования MPT агентов с высоким значением r<sub>1</sub>. Агенты T<sub>1</sub> для получения усиленного положительного контраста обычно используют наноматериалы на основе гадолиния [265].

Использование суперпарамагнитных НЧ оксида железа в качестве контрастных агентов было одобрено клинически [266,267], и были проведены исследования, включающие большее разнообразие суперпарамагнитных НЧ, что позволило получить дополнительное представление о параметрах, влияющих на  $r_2$ . Zhen и др. заметили, что благодаря более высокой кристалличности кубические НЧ  $Fe_3O_4$  показали в четыре раза меньшее время релаксации и, следовательно, лучший контраст изображения по сравнению со сферическими НЧ  $Fe_3O_4$  [261]. Нанокубы  $Fe_3O_4$  размером 22 нм (длина грани) продемонстрировали коллоидную стабильность и высокую релаксивность  $r_2$ , что позволило успешно использовать их в экспериментах *in vivo*, используя 3-Т МР-сканера [268].

Основываясь на исследованиях, доступных в настоящее время в литературе, сложно сделать широкие выводы о влиянии той или иной формы на магнитные свойства НЧ. Стоит отметить, что влияние формы НЧ на магнитные свойства может быть использовано в качестве мощного инструмента для повышения эффективности НЧ в бионаномедицине.

#### Влияние состава на магнитные свойства НЧ

Наиболее частый параметр, который влияет на магнитные свойства НЧ, является материал магнитной фазы, входящей с состав НЧ. Влияние состава НЧ на магнитные свойства может быть изучено путем выбора метода синтеза НЧ, варьирования концентрации прекурсора, природы допирующей примеси, а также путем контроля постсинтетических катионных обменов. Катионы металлов в составе ферритов различного состава, влияют как на физические свойства, так и на магнитные свойства НЧ [269]. Результаты этих исследований представлены ниже (Таблица 6). Larumbe и др. изучили влияние допирования никелем НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, где Ni<sup>2+</sup> частично вытеснил Fe<sup>2+</sup> из октаэдрических участков [270]. Температура блокировки НЧ Ni<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> достигла максимума для состава Ni<sub>0.06</sub>Fe<sub>2.94</sub>O<sub>4</sub> (выше, чем для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), однако существенных изменений Ms не произошло. НЧ сложных оксидов железа размером 5 нм допированные кобальтом показали максимальное значение Ms и температуры блокировки (TB) при промежуточном составе 0,5 < x < 1 в Co<sub>x</sub>Fe<sub>(8/3-2x/3)</sub>O<sub>4</sub> [269].

В другом примере при катионном обмене  $Co^{2+}$  на  $Fe^{2+}$  при синтезе НЧ  $Fe_3O_4$  (FeFe\_2O\_4) температура блокировки и коэрцитивная сила полученных НЧ  $CoFe_2O_4$  значительно возросли [271]; температура блокировки увеличилась с 250 К до 310 К, а коэрцитивная сила в два раза. Авторы предположили, что более высокая спин-орбитальная связь в узлах  $Co^{2+}$  приводит к повышенной магнитной анизотропии и, следовательно, к более высокой температуре блокировки и коэрцитивной силе. Катионный обмен является эффективным инструментом для получения НЧ сложных оксидов железа различного состава с определенными магнитными свойствами, предназначенными для конкретных применений.

Наночастицы	Размер, нм	Способ изменения состава	Ms , А∙м²/кг	Коэрцитив ная сила
FeFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [272]	200		81.9	
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [272]	200	Варьирование	53.2	
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [272]	200	прекурсоров	61.6	
ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [272]	200		60.0	
FeFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [273]	12		101	
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [273]	12	Варьирование	110	
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [273]	12	прекурсоров	99	
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [273]	12		85	
$Ni_{0.8-}$ $_{x}Zn_{0.2}Mg_{x}Fe_{2}O_{4}$ [274]		Departmente		
X=0	36	газличные соотношения прекурсоров	43.1	65.8 кА/м
0.2	41		41.7	57.0 кА/м
0.4	45		41.0	35.0 кА/м
0.6	35		30.4	17.4 кА/м
0.8	59		36.1	11.9 кА/м
FeFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [269]	8	Departure	80.1	153 Oe
Ni <sub>0.04</sub> Fe <sub>2.96</sub> O <sub>4</sub> [269]	8	газличные	84.2	180 Oe
Ni <sub>0.06</sub> Fe <sub>2.94</sub> O <sub>4</sub> [269]	10	СООТНОШЕНИЯ	80.5	250 Oe
Ni <sub>0.11</sub> Fe <sub>0.89</sub> O <sub>4</sub> [269]	8	прекурсоров	82.8	190 Oe
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -				
различное				
соотношение				
катионов		I АЗЛИЧНЫС Метопы синтера		
Сферическое фрезирование	200	методы синтеза	80.9	1750 Oe
Золь-гель метод	200		83.1	500 Oe

Таблица 6 – Влияние состава на магнитные свойства НЧ

В некоторых случаях магнитное поведение НЧ также может зависеть от растворителя, используемого при их синтезе. Clavel и др. наблюдали, что НЧ ZnO, допированные Mn, полученные в высококипящем растворителе, бензиловом спирте или смеси растворителей анизол/бензиловый спирт (95/5%), обладают парамагнитными свойствами, однако те же НЧ, допированные кобальтом, полученные в бензиловом спирте, обладали ферромагнитными и антиферромагнитными свойствами, используя систему растворителей анизол/бензиловый спирт [275].

Особое внимание стоит также уделить методу, которым получены НЧ. Chaubey и др. используя метод термического разложения, получали наносферы FeCo диаметром 10 и 20 нм с намагниченностью насыщения Ms 129 эму/г и 207 эму/г соответственно [276]. Эти авторы также нашли оптимальное молярное соотношение Fe:Co (1,5:1), для которого Ms максимальна. В отдельном исследовании HЧ, состава Fe<sub>100-x</sub>Co<sub>x</sub>, Chinnasamy и др. также наблюдали более высокий Ms для HЧ, имеющих в своем составе больше Fe, чем Co [277].

Еще одним важным параметром НЧ, на который может влиять состав, является температура Кюри (Тс). Это температура, выше которой НЧ показывают нулевую намагниченность. Использование НЧ с достаточно низкой температурой Кюри позволяет избежать перегрева при гипертермии [61], так как такие НЧ являются своего рода предохранителями от перегрева. Например, при изменении содержания алюминия в НЧ, имеющих формулу  $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$  ( $0 \le x \le 2$ ), температура Кюри изменяется в диапазоне от -40 до 280 °С. Состав был скорректирован путем катионного обмена, где катионы Fe<sup>3+</sup>, занимающие тетраэдрические и октаэдрические участки, были заменены немагнитными катионами Al<sup>3+</sup>, что привело к снижению намагниченности насыщения по мере увеличения содержания Al<sup>3+</sup>. Тс для этих НЧ достигала комнатной температуры, когда содержание  $Al^{3+}$  составляло 1.5 < x < 1.8 [278]. Аналогичный катионный обмен  $Sr^{2+}$ или  $Ti^{4+}$ в НЧ состава  $La_{1-x}Sr_xMn_{1-y}Ti_yO_3$ привел к снижению Tc c ~90 °C до ~20 °C; HЧ  $La_{1-x}Sr_xMn_{1-y}Ti_yO_3$ ,-замещенные Ті<sup>4+</sup> имели более высокие значения Ms и более резкие переходы Tc по сравнению с НЧ  $La_{1-x}Sr_xMn_{1-y}Ti_yO_3$ , замещенные  $Sr^{2+}$  [279]. Miller и др. исследовали влияние фазы материала на Тс: для НЧ FeNi Tc показывала пониженные значения только для у-фазы [280]. НЧ Fe<sub>73</sub>Ni<sub>27</sub> демонстрировали температуру Кюри 550 °С в фазе α-Fe и 120 °С в γ-фазе.

Состав обеспечивает основное влияние на магнитное поведение НЧ и напрямую влияет на Ms и коэрцитивную силу. Параметры, которые влияют на Tc, не так хорошо изучены и требуют дополнительных исследований.

# Влияние поверхностной модификации НЧ на их магнитные свойства

Правильно подобранный стабилизирующий агент позволяет НЧ быть биосовместимыми и стабильными в физиологических растворах, пригодными для дальнейшей функционализации, и что самое главное, позволяет сохранять свои магнитные свойства. Larumbe и др. оценили влияние покрытия SiO<sub>2</sub> на магнитные свойства НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и обнаружили снижение Ms, низкую коэрцитивную силу и значение SAR для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> по сравнению с голым ядром Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [281]. Авторы объяснили, что снижение, как намагниченности, так и SAR, происходит за счет поверхностных спиновых эффектов. Кроме того, они обнаружили, что температура блокировки также снизилась для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>. Другие HЧ покрытые SiO<sub>2</sub> (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) показали аналогичные результаты, однако. снижение коэрцитивной силы варьировалось в зависимости от состава ядра [282,283]. Vestal и др. показали, что намагниченность насыщении Ms ферритов, покрытых кремниевой оболочкой, уменьшается, как и ожидалось, однако коэрцитивная сила для НЧ  $MnFe_2O_4$ -SiO<sub>2</sub> и HЧ CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> уменьшается на 10% и 1% соответственно. Это различие, скорее всего, связано с различием в магнитокристаллической анизотропии MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0,056 Дж/см<sup>3</sup>) и CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0,22 Дж/см<sup>3</sup>). Изменение анизотропии и коэрцитивной силы более заметно в случае материалов с меньшей анизотропией ядра. В отличие от большинства исследований, которые показывают пониженную намагниченность для НЧ, покрытых немагнитным слоем, Woo и др. продемонстрировали более высокую Ms для покрытых кремниевой оболочкой и функционализированных аминами НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [284]. У полимерных оболочек, так же, как и у кремниевых, есть свои преимущества и недостатки. Влияние N-изопропилакриламида (NIPAM) на магнитные свойства НЧ приведены ниже (Таблица 7). НЧ покрытые биосовместимыми водорастворимыми полимерами, обладают превосходными свойствами. В настоящее время ведется оптимизация методик синтеза таких НЧ, применяемых в качестве контрастных агентов для МРТ [285,286]. По мере увеличения толщины покрытия (например, SiO<sub>2</sub> или полиэтиленгликоля) релаксивность  $(r_2)$  уменьшается [287,288], поэтому использование тонкого покрытия, позволит получить более эффективный контрастный агент. Үе и др. в своем исследовании для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- SiO<sub>2</sub> показали снижение продольной релаксивности ( $r_1$ ), что привело к увеличению отношения  $r_2/r_1$  и показателя эффективности МРТ [287]. Для этого эксперимента НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, покрытые кремнеземом, были ~21 и ~14 раз эффективнее, чем коммерчески доступные контрастные агенты из оксида железа, Feridex и Resovist, соответственно. Таким образом, природа магнитного ядра НЧ, состав покрытия и его толщина играют важную роль для повышения эффективности и дальнейшего применения в МРТ диагностике.

Различные пути синтеза НЧ, комбинации прекурсоров и стабилизирующих агентов оптимизируются и позволяют изменять магнитные свойства НЧ (намагниченность насыщения и коэрцитивная сила). Ниже кратко изложен ряд таких исследований (Таблица 7).

НЧ	Размер,	Ms.	Коэрцитив-	T <sub>B</sub> ,	SAR/SLP
(покрытие@ядро)	НМ	эму/г	ная сила (Oe)	K	(Вт/г)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [282]	5	72	0	160	1.5
					1.08
SiO <sub>2</sub> @Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [282]	7	37	0	120	При частоте 340 кГц и 170-340 Ое
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [289]	9.3	75.7	1.1		
PNIPAM@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [289]	12	51.6	5		
Co [290]	2.7			16	
Pt@Co [290]	3.0			108	
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Ni@MnFe 2O4 [288]	200	74	89		
	202	30	89		
FePt [291]	4	1040	5500		
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @ FePt [291]	6	950	13500		
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [292]	9				450
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [292]	15				450
					2250
$CoFe_2O_4$ [292]	12				При частоте 500 кГц и 37,3 кА/м
Zn <sub>0,4</sub> Fe <sub>2,6</sub> O <sub>4</sub> [230]	50	190	140	320	4060
CoEo O @					10600
$Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4$ [230]	60	130	1900		При частоте 500 кГц и 37.4 кА/м

Таблица 7 – Влияние различных типов покрытий на магнитные свойства НЧ

Особый интерес представляют работы Noh и др., которые синтезировали кубы состава  $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ , используя в качестве покрытия CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> и наблюдали плавную кривую гистерезиса и 14-кратное увеличение коэрцитивной силы по сравнению с голым ядром [230]. Это увеличение привело к значительно более высокому SAR для HЧ с оболочкой CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@  $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$  (10 600 BT/г) по сравнению с HЧ, состоящими только из ядра  $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$  (4060 BT/г).

обобщенные Исследования, В ЭТОМ разделе, В совокупности иллюстрируют проблемы, с которыми сталкиваются ученые при создании единого алгоритма оптимизации магнитных свойств НЧ для применения в различных сферах, в частности в биомедицине. Магнитные свойства сильно зависят от множества взаимосвязанных между собой факторов. Мы выделили несколько важных корреляций между определенными магнитными ΗЧ насыщения, свойствами (намагниченность коэрцитивная сила, температура блокировки и время релаксации) и выбранными физическими параметрами (размер, форма, состав и архитектура оболочки-ядра), которые могут быть избирательно и разумно модулированы. Такая модуляция НЧ должна привести к еще более широкому спектру применений для этого интересного класса наноматериалов.

## 2 Результаты

## 2.1 Синтез НЧ

## Синтез сферических НЧ (НЧсф)

Просвечивающая электронная микроскопия НЧ, отобранных сразу по достижении температуры 210 °С показала наличие наночастиц со средним размером 6±1,5 нм (Рисунок 32).



Рисунок 32 – Изображения НЧ, полученные в режиме сканирующей просвечивающей темнопольной электронной микроскопии в электронах, рассеянных на большие углы (high angle annular dark field scanning transmission electron microscopy, HAADF-STEM).

НЧ представляют собой сферические или близкие к сферическим кристаллические наночастицы с размером 4-6 нм.

При кипячении НЧ при температуре 210 °C в течение 40 часов происходит увеличение размеров НЧ до 10 нм (Рисунок 33).



Рисунок 33. Электронная микрофотография НЧ после 40 часов кипячения при 210 °C.

# Синтез кубических НЧ (НЧкуб)



Микрофотографии синтезированных кубических наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>



Рисунок 34. – Схематическое изображение методики синтеза КНЧМ и модификации их поверхности блок-сополимерами Pluronic (A), а также

ПЭМ-микрофотографии полученных КНЧМ (Б) (шкала: 50 нм).

Реагенты и условия: (1) C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (олеиновая кислота);C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/H<sub>2</sub>O; 80°C, 4 ч (2) C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (олеиновая кислота); C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>ONa (олеат натрия); C<sub>18</sub>H<sub>36</sub> (1-октадецен); Ar; 314°C, **10 нм:** Fe(OL)<sub>3</sub>/C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> = 9/1;**15 нм:** Fe(OL)<sub>3</sub>/C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> = 3/1;**20 нм:** Fe(OL)<sub>3</sub>/C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> = 1/1; (3) C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (олеиновая кислота); C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>NH<sub>2</sub> (олеиламин); C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (1,2-гексадекандиол); (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O (дибензиловый эфир); Ar; 296°C; (4) C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/H<sub>2</sub>O (V/V = 1/4);Pluronic F-127; Ar; 25°C

Из анализа образцов методом ПЭМ было установлено, что все НЧ были монодисперсными и имели ярко выраженную кубическую морфологию (Рисунок 34).

#### Синтез кластерных НЧ (НЧкл)

Было обнаружено, что природа органической кислоты влияет как на морфологию отдельных наночастиц, так и на общую структуру НЧкл. Так, по результатам ПЭМ было установлено, что образцы К1, К2, К4, К6, К10, К11 и К14 представляют собой кластерные наноструктуры с различной формой. Образцы К3, К5, К7, К8, К9, К13 представляют собой ограненные сферы различного размера (Рисунок 35) [293].



Рисунок 35 – ПЭМ-микрофотографии синтезированных НЧкл.

Исследование полученных НЧ методом просвечивающей микроскопии высокого разрешения позволило установить, что получаемые кластеры формируются из отдельных НЧ в процессе синтеза за счет самосборки. Из полученных микрофотографий можно видеть, что отдельные НЧ в образцах К1 и К14 случайно дезориентированы относительно направления первичного электронного пучка, но при этом каждая отдельная НЧ внутри кластера представляет собой достаточно совершенную монокристаллическую частицу с одинаковой ориентацией (Рисунок 36) [293]. Кроме того в образцах были обнаружены индивидуальные НЧ, наличие которых подтверждает гипотезу об образовании НЧкл путем спонтанной ориентированной агрегации, а не путем роста новых НЧ на существующих зародышах (Рисунок 37).



Рисунок 36 – ПЭМ-микрофотографии высокого разрешения НЧкл. Микрофотографии образцов К1 (1) и К14 (2); процесс формирования кластера К14 (3); электронные дифрактограммы образцов К1 (4) и К14 (5).



Рисунок 37 – ПЭМ-микрофотографии КлНЧМ К1 и К14.

Присутствие органических кислот на поверхности НЧ было подтверждено методом ИК спектроскопии. Пик при 581 – 588 см-1 соответствует колебанию связей Fe – О во всех образцах [294] и присутствует во всех зарегистрированных спектрах. Пики при 1420 см-1 соответствуют валентным колебаниям карбоксильных групп и наблюдаются в каждом ИКспектре образцов, синтезированных с добавлением циклокарбоновых кислот [295]. 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 KBr. Пик при 1735 см-1 соответствует вибрациям карбонильной группы С=О [293].



2.2 Синтез стержневидных НЧ (НЧст)

Рисунок 38 – Схематическое изображение методики синтеза и модификации НЧст (А) и ПЭМ-микрофотографии синтезированных НЧст (Б). Реагенты и условия: (i) дофамин (D-0) или ПЭИ (N-0), 80°С, 2 ч; (ii) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (50-60%), NaOH, 100°С; (iii) 1) OA, УЗ-обработка 2) н-гексан/H<sub>2</sub>O; Pluronic F-127; Ar; 25°С, 24 ч.



Рисунок 39 – ПЭМ-микрофотографии прекурсоров (D-0 и N-0) и образцов НЧМ, полученных после их восстановления.

## Синтез НЧ феррита кобальта (ФК)

Процессы получения НЧ замещенных ферритов в общем случае проходят в тех же условиях, что и получение НЧ оксида железа. Данные НЧ могут быть получены, как реакциями соосаждения в водной среде, так и высокотемпературным разложением металлорганических прекурсоров, за исключением того, что в качестве исходника вместо солей железа (II) используются соответствующие соли других двухвалентных металлов, таких как кобальт, марганец или цинк.

Изображения ЭД всех исследованных образцов могут быть проиндицированы в *F*-центрированной кубической ячейке с параметром *a* ~ 8.38 Å. Межплоскостные расстояния 4.80 Å, 2.96 Å, 2.55 Å, 2.11 Å, 1.71 Å, 1.62 Å и 1.49 Å (Рисунок 40 (4)) хорошо согласуются с семействами плоскостей (110), (220), (311), (400), (422), (511) и (440), соответственно [296].



Рисунок 40 – Микрофотографии образцов НЧ, полученные методом электронной микроскопии.1 – светлопольные ПЭМ изображения НЧ, 2,3 – HAADF-STEM изображения НЧ, 4 – изображения ЭД образцов НЧ с указанием основных межплоскостных расстояний.

Средний размер НЧ закономерно увеличивался при переходе от образца ФК-1 к образцу ФК-4. Одновременно с этим возрастал и разброс НЧ по размерам, что отражается на величине стандартного отклонения (Таблица 8).

Таблица 8 – Средний размер НЧ, рассчитанный с использованием программного обеспечения ImageJ

Образец	ФК-1	ФК-2	ФК-3	ФК-4
Средний размер НЧ (нм) и стандартное отклонение (нм)	12.8± 1.1	24.3 ± 3.5	78.5 ± 11.6	125.2 ± 21.1

Другой тип наночастиц феррита кобальта (ФКсф) был получен методом соосаждения солей железа (III) и кобальта (II) гидроксидом натрия при повышенной температуре в водной среде. По данным ПЭМ полученные НЧ имеют близкую к сферической морфологию (Рисунок 41). Размер НЧ равен 12±4 нм.



Рисунок 41 – ПЭМ-микрофотография НЧ<sub>ко</sub>, полученные соосаждением солей железа (III) и кобальта (II) при кипячении

#### 2.3 Структура и физические свойства НЧ

#### Структура и физические свойства НЧсф

Согласно данным рентгенофазового анализа кристаллическая структура НЧ<sub>сф</sub> совпадает с кристаллической структурой магнетита. Крайне малый размер НЧ обеспечивает большую долю поверхностных атомов, что в свою очередь отражается в уширении пиков на рентгенограмме. Можно отчетливо различить основные пики, соответствующие дифракции на плоскостях (220), (311), (400), (422), (511), (440), присутствующих в кристаллической структуре магнетита (Рисунок 42А). Схожая кристаллическая структура и параметры решетки для магнетита и маггемита делают невозможным установление точной структуры для НЧ<sub>сф</sub>. Для точного определения структуры НЧ<sub>сф</sub> нами была использована Мёссбауровская спектроскопия. При температуре 300 К спектр представлен одним парамагнитным компонентом (дублетом) со сверхтонкими параметрами: изомерный сдвиг  $\delta = 0.34(1)$  мм/с, квадрупольное расщепление  $\Delta = 0.74(1)$  мм/с (Рисунок 42В). Полученные данные свидетельствуют, что скорость переориентации магнитного момента НЧ при комнатной температуре выше скорости колебания источника, что приводит к тому, что в процессе движения источника и снятия сигнала НЧ успевают изменить направление своего магнитного момента, что в свою очередь свидетельствует об их суперпарамагнитной природе при комнатной температуре. Спектр этих же НЧ, полученный при температуре 10К представлен характерным секстетом (Рисунок 42Г). Отсутствие расщепления свидетельствует 0 наличии только ионов  $\mathrm{Fe}^{3+}$ линий спектра В кристаллической решетке. Таким образом, можно сделать вывод, что получаемые описанным методом НЧ<sub>сф</sub> состоят преимущественно из маггемита Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



Рисунок 42 – Структурные и магнитные свойства HЧ<sub>cф</sub>. Рентгенограмма порошка HЧ<sub>cф</sub> (A). Кривая намагниченнности порошка HЧ<sub>cф</sub> (Б). Мёссбауэровские спектры HЧ<sub>cф</sub> при 300 K (В) и 10 K (Г).

Намагниченность насыщения для НЧсф достигает значений равных 55 А м<sup>2</sup> кг<sup>-1</sup>, что ниже, чем для массивного маггемита и обусловлено малым размером НЧсф (Рисунок 42Б).

## Структура и физические свойства НЧкуб

Анализ данных рентгеновской дифракции показал наличие максимумов интенсивности при углах 21.28°, 35.10°, 41.41°, 43.35°, 50.48°, 62.97°, 67.28° и 74.18°, положение и относительная интенсивность которых соответствуют плоскостям кристалла (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) и (440) и соответствуют кристаллической структуре магнетита (Рисунок 43А). Для всех образцов также был определен параметр решетки *a*, который соответствует параметру решетки для чистого магнетита (a = 0,8396 нм, JCPDS №19-0629), в то время как сами НЧ<sub>куб</sub> являются монокристаллами, о чем свидетельствует

корреляция данных о размере НЧ<sub>куб</sub>, полученных методами рентгеноструктурного анализа и ПЭМ.



Рисунок 43 – Структурные и магнитные свойства НЧ<sub>куб</sub>. Рентгенограмма порошка НЧ<sub>куб</sub> (А). Кривая намагниченнности порошка НЧ<sub>куб</sub> (Б).

Размер НЧ, определенный с помощью ПЭМ, коррелирует с размером кристаллита, рассчитанному по результатам их рентгенофазового анализа, что позволяет сделать вывод о том, что полученные НЧ представляют собой монокристаллы. Намагниченность насыщения возрастает при увеличении размеров НЧ, достигая максимума для НЧ<sub>куб</sub>-30. Данное поведение объясняется уменьшением доли атомов, находящихся на поверхности с увеличением размера НЧ (Таблица 9). При этом для всех типов НЧ<sub>куб</sub> на кривой намагниченности отсутствовал магнитный гистерезис, что позволяет говорить об их суперпарамагнитных свойствах при комнатной температуре.

Таолица 🦯		ukrephernkn ir ikye	
Образец	Параметр	Размер	Удельная
	решетки	кристаллита, нм	намагниченность
	наночастиц,		насыщения
	HM		$J_{ m S}$ , ${ m Am}^2 \cdot$ кг $^{-1}$
<i>НЧ<sub>куб</sub>-10</i>	0,8414(5)	9,462(6)	35
<i>НЧ<sub>куб</sub>-15</i>	0,8390(5)	14,104(18)	65
<i>НЧ<sub>куб</sub>-20</i>	0,8435(11)	20,20(12)	70
<i>НЧ<sub>куб</sub>-30</i>	0,83960(18)	34,91(11)	74

Таблица 9 – Основные характеристики НЧкуб

# Структура и физические свойства НЧкл

Для НЧкл были определены статические магнитные свойства, а структура НЧ<sub>кл</sub> была исследована с помощью метода РФА. Данный метод показал, что НЧ являются многодоменными поликристаллическими структурами со структурой Fe<sub>3</sub>O4 (Таблица 10).

Обра	Размер по	Размер	Параметр	Удельная	Остаточна
зец	ПЭ́М	кристал-	решетки	намагничен-	Я
	(диагональ),	лита, нм	наночастиц,	ность	намагниче
	HM		HM	насыщения	нность, $J_{\rm R}$ ,
				$J_{ m S}$ , ${ m A}\cdot{ m m}^2\cdot{ m k}{ m \Gamma}^{-1}$	$Aм^2 \cdot \kappa \Gamma^{-1}$
K1	41±10	18,4(3)	0,8392(6)	81,5	4,2
К2	40±11	16,4(3)	0,8394(9)	80,5	4,3
К4	31±6	13,3(4)	0,8387(3)	77,2	1,4
К6	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

Таблица 10 – Основные физические характеристики образцов НЧкл

Все НЧ показывают высокие значения намагниченности насыщения, характерные для массивных образцов. Данное явление может быть объяснено магнитостатическими взаимодействиями между отдельными наночастицами магнетита, в результате которых происходит упорядочивание магнитных моментов отдельных МНЧ, приводящее к повышенным значениям *J*<sub>S</sub> по принципу суперпозиции [236,293]. Можно видеть, что как значения коэрцитивности, так и удельной намагниченности насыщения возрастают с увеличением размера КлНЧМ, что согласуется с ранее опубликованными данными для магнитных нанокластеров (Рисунок 44) [297].



Рисунок 44 – Зависимость магнитных характеристик НЧкл от размера их магнитного ядра

## Структура и физические свойства НЧст

Для каждого из продуктов на этапе двухстадийного синтеза их строение анализировалось методом РФА. Для обоих прекурсоров (D-0 и N-0) было показано наличие немагнитной фазы акагенита  $\beta$ -FeOOH (a = 10,535 Å, c = 3,030 Å, ICDD 34–1266) (Рисунок 45).



Рисунок 45 – Рентгенограммы образцов HЧ<sub>ст</sub> N-0 и D-0

После восстановления прекурсоров на рентгенограммах наблюдаются новые дифракционные пики, которые могут быть отнесены к фазе магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (a = 8,396 Å, ICDD №19–0629) или маггемита γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (a = 8,346 Å, ICDD №39–1346) (Рисунок 46).



Рисунок 46 – Рентгенограммы образцов НЧст

Для образцов НЧст D-1 и N-1 намагниченность насыщения составила 14,1 и 54,4 А·м<sup>2</sup>·кг<sup>-1</sup>, а коэрцитивная сила 67 и 112 Э, соответственно. Низкие значения намагниченности насыщения для образца D-1, скорее всего, объясняются наличием немагнитной фазы. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии суперпарамагнитных свойств для полученных нами НЧст. Значения T2 релаксивности для образцов D-1 и N-1 были равны 14 и 51 мМ<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>·, соответственно. Параметры SAR и ILP для образцов с шифрами N-1, N-2 и N-3 представлены ниже (Таблица 11).

Шифр образца	Индукция, <i>Н</i> (кА·м <sup>-1</sup> )	Частота, f (кГц)	SAR, B⊤·г <sup>-1</sup>	ILP, нГн∙м²∙кг <sup>-1</sup>
N-1			147±14	$1,4\pm0,09$
N-2	20	261	87±9	0,8±0,12
N-3			56±8	0,5±0,13

Таблица 11 – Параметры SAR и ILP НЧст.

#### Структура и физические свойства наночастиц феррита кобальта

Фазовый состав образцов наночастиц феррита кобальта (ФК 1-4) был изучен методом рентгенофазового анализа (РФА). Хорошо определенные и узкие дифракционные пики от характерных кристаллографических плоскостей (220), (311), (222), (400), (422), (511) и (440), а также соотношение их интенсивностей, указывают на образование однофазной структуры шпинели (Рисунок 47).



Рисунок 47 – Рентгенограммы образцов НЧ с индексацией характерных кристаллографических плоскостей

Параметр решетки фазы является постоянной величиной и не зависит от индексов рефлекса и угла дифракции 20. Однако, различные факторы могут вносить погрешности в получаемые значения. В частности, повышение точности определения параметра решетки возможно с помощью экстраполяционной функции Нильсона-Райли.
$$F(\theta) = \frac{1}{2} \left( \frac{\cos^2 \theta}{\sin \theta} + \frac{\cos^2 \theta}{\theta} \right) \quad (1)$$

Ранее было показано, что применимость данной функции прослеживается в узком интервале углов дифракции  $\theta > 30^{\circ}$ , т.е. при аргументах  $F(\theta) \le 1,2$  [298]. Так, например, для определения параметра решетки фазы образца ФК-3 были выбраны 6 угловых значений – максимумов интенсивностей, и проведены соответствующие расчеты (Таблица 12).

Таблица 12 – Основные расчетные параметры кристаллической решетки для образца ФК-3

20		k	l	$F(\theta)$	d/n	a, Å
62,85	4	2	2	1,3621	1,7156	8,4045
74,05	4	4	0	1,0224	1,4854	8,4028
116,85	8	0	0	0,2953	1,0499	8,3991
129,3	6	6	0	0,1826	0,9898	8,3984
134,55	5	1	7	0,1444	0,9697	8,3982
144,6	4	0	8	0,0851	0,9389	8,3978

В результате, была установлена линейная угловая зависимость параметра решетки фазы (Рисунок 48) со значением a = 8,3975 Å, что достаточно хорошо согласуется с параметром решетки массивного феррита кобальта a = 8,377 (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, ICDD No.22-1086).



Рисунок 48 – Угловая зависимость параметра решетки фазы для образца

ФК-3

Сопоставление размеров НЧ, установленных из рентгеноструктурного анализа и просвечивающей электронной микроскопии, свидетельствует о том, что образцы ФК-1 и ФК-2 являются монокристаллами, тогда как образцы ФК-3 и ФК-4 имеют поликристаллическую структуру (Таблица 13).

Таблица 13 – Основные результаты рентгеноструктурного анализа образцов НЧ.

Шифр образца	Тип решетки	Пространст- венная группа	ОКР (нм)	Микронапряжения, %	Период решетки, <i>а</i> , нм
ФК-1			12.4	0.0001	0.8373
ФК-2	H1.1	Fd3m	26.4	0.007	0.8390
ФК-3			31.0	0.04	0.8398
ФК-4			32.6	0.06	0.8397

свойств образцов ΗЧ Исследование магнитных (удельная намагниченность насыщения  $J_{\rm S}$ , остаточная удельная намагниченность  $J_{\rm R}$ , коэрцитивная сила  $H_{\rm C}$ ) осуществлялось при комнатной температуре в системе Quantum Design PPMS DynaCool, оснащенной опцией вибрационной Для магнитометрии. регистрации петель магнитного гистерезиса подготавливались сухие порошки НЧ, тогда как удельная намагниченность каждого образца рассчитывалась по концентрации железа, измеренной с помощью атомной эмиссионной спектроскопии (АЭС)

(Рисунок 49).



Рисунок 49 – Петли магнитного гистерезиса образцов НЧ, зарегистрированные при T = 300 К

Рисунок 50Б показывает кривые нагрева-охлаждения 200 мкл коллоидного раствора НЧ ФК-1 в хлороформе с концентрацией 8 мг НЧ/мл. Из полученных графиков можно видеть, что скорость нагрева коллоидных растворов возрастает как с увеличением амплитуды поля, так и с увеличением его частоты.

111



Рисунок 50 – Магнито-жидкостная гипертермия для образца ФК-1. А – фотографии коллоидного раствора образца ФК-1, полученные при различных значениях напряженности магнитного поля, частоты и продолжительности

#### экспозиции,

Б – кривые нагрева-охлаждения коллоидного раствора образца ФК-1

Ниже представлены режимы, при которых осуществлялась МЖГ, а также значения SAR и ILP, рассчитанные для образца ФК-1 (Таблица 14).

Индукция, <i>Н</i> (кА·м <sup>-1</sup> )	Частота, f (кГц)	SAR, BT·r <sup>-1</sup>	ILP, нГн∙м²∙кг⁻¹	ILP, нГн∙м²∙кг <sup>-1</sup>
20	261	$98.4 \pm 10.7$	$0.63\pm0.07$	0.76 + 0.09
20	393	$92.8\pm8.7$	$0.88\pm0.08$	$0.76 \pm 0.08$
9.6	393	$28.7 \pm 7.1$	$0.79\pm0.20$	$0.79\pm0.20$

Таблица 14 – Параметры поля и значения SAR и ILP для образца ФК-1

Фазовый состав образца ФКсф также был установлен методом РФА при комнатной температуре. Значение параметра решетки a = 8.370 Å согласуется с параметром решетки массивного феррита кобальта a = 8,377 (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, ICDD) Сопоставление ΗЧ ФКсф, No.22-1086). размера установленного ИЗ рентгеноструктурного ПЭМ, анализа свидетельствует И 0 монокристаллической природе образца (Таблица 15).

Таблица 15 – Основные результаты рентгеноструктурного анализа образца ФКсф

Шифр образц	Тип решетк	Пространственн ая группа	ОК Р	Микронапряжени я. %	Период решетк
a	И	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	(HM)	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	и, <i>а</i> , нм
ФКсф	H1.1	Fd3m	9.3	0.001	0.8370

По результатам магнитометрии было установлено, что для полученных НЧ  $J_{\rm S} = 75 \ {\rm A} \cdot {\rm m}^2 \cdot {\rm kr}^{-1}$ , что сопоставимо с аналогичным значением для образца ФК-3 и соответствует предсказанным значениям для объемного материала ( $J_{\rm S} = 80 \ {\rm A} \cdot {\rm m}^2 \cdot {\rm kr}^{-1}$ ) (Рисунок 51).



Рисунок 51 – Петли магнитного гистерезиса образца ФКсф, зарегистрированные при T = 300 К

Значение остаточной намагниченности и коэрцитивной силы составили  $J_{\rm R} = 4 \, {\rm A} \cdot {\rm M}^2 \cdot {\rm kr}^{-1}$  и  $H_{\rm C} = 3 \, {\rm kA} \cdot {\rm M}^{-1}$ , что свидетельствует о ферромагнитной природе НЧ и, как и в случае образцов ФК, согласуется с ранее установленным критическим размером зерен (6 – 8 нм), ниже которого CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> переходит в суперпарамагнитное состояние [299].

Далее, по аналогии с образцами ФК-1, для образца ФКсф были зарегистрированы кривые нагрева-охлаждения в ВПМП 200 мкл водного коллоида НЧ ФК-с с концентрацией 15.3 мг НЧ/мл (Рисунок 52).



Рисунок 52 – Магнито-жидкостная гипертермия для образца ФК-сф. А – фотографии коллоидного раствора образца ФК-с, полученные при различных значениях напряженности магнитного поля, частоты и продолжительности экспозиции,

Б – кривые нагрева-охлаждения коллоидного раствора образца ФК-с

Ниже представлены режимы, при которых осуществлялась МЖГ, а также значения SAR и ILP, рассчитанные для образца ФК-с (Таблица 16).

Индукция, <i>Н</i> (кА·м <sup>-1</sup> )	Частота, f (кГц)	SAR, BT·r <sup>-1</sup>	ILP, нГн∙м <sup>2</sup> ·кг <sup>-1</sup>
20	261	$185.8\pm13.5$	$1.78\pm0.09$
	393	$260.11 \pm 18.6$	$1.65 \pm 0.12$
9.6	393	$55.7\pm4.8$	$1.54\pm0.13$

Таблица 16 – Параметры поля и значения SAR и ILP для образца ФК-1

Их полученных данных можно видеть, что средние значения ILP для образца ФКсф для двух различных напряженностей ВПМП поля хорошо согласуются друг с другом. Кроме того, полученные значения ILP в 2 раза превышают аналогичные значения для образца ФК-1, несмотря на идентичность размеров НЧ, и сравнимы с максимальными значениями ILP, известными из литературы [300,301]. Более высокое значение ILP для образца ФКсф, в сравнении с образцом ФК-1, можно объяснить путем сравнения значений удельной намагниченности образцов. Так, при напряженности ВПМП H = 20 кА·м<sup>-1</sup>, для образца ФКсф удается достичь максимальной удельной намагниченности J, которая составляет 40%·J<sub>S</sub> или 30 A·м<sup>2</sup>·кг<sup>-1</sup>, что в 2 раза выше аналогичного значения для образца ФК-1 (15 A·м<sup>2</sup>·кг<sup>-1</sup>).

#### 2.4 Разработка методов стабилизации НЧ в водных растворах

#### Стабилизация НЧсф

Для подтверждения структуры НЧ сф нами было проведено исследование образцов НЧсф, покрытых ЧСА методом темнопольной микроскопии с энергодисперсионным анализом (Рисунок 53).



Рисунок 53 – ПЭМ микрофотография НЧсф, покрытых ЧСА в темнопольном режиме (A). Элементное картирование для N (Б), Fe (B), O (Г)

На полученных изображениях отчетливо видны отдельные НЧ, окруженные менее контрастной оболочкой. Элементное картирование показывает наличие атомов азота в этой оболочке, что позволяет утверждать, что в состав этой оболочки входят молекулы белка, так как другие компоненты не содержат азота. В свою очередь атомы железа и кислорода сосредоточены в областях соответствующих НЧ, на ПЭМ изображениях.

Полученные НЧсф, покрытые СА (НЧ-СА) стабильны в водной среде при рН 7.4, содержащей 0,9% NaCl. Гидродинамический диаметр НЧ-ЧСА составляет 20-40 нм, а дзета потенциал равен -30 мВ. Содержание белка было установлено методом термогравиметрического анализа и составляет 50-60 % масс. За счет большого содержания белка НЧ-ЧСА могут быть лиофилизованы с последующим ресуспендированием без потери коллоидной устойчивости и агрегации.

Значение T2 релаксивности для HЧ-ЧСА составило 160 мМ-1с-1, что выше, чем у коммерчески доступного аналога Feraheme<sup>®</sup> ( $r2 = 89 \text{ мM}^{-1}\text{c}^{-1}$ ), но ниже, чем максимальные значения T2 релаксивности, полученные в других работах.

#### Стабилизация НЧкуб

Для стабилизаци НЧкуб нами было решено использовать покрытие на основе плюроников (триблоксополимера полиэтиленгликоля И полипропиленгликоля). Покрытие НЧкуб плюрониками приводило к получению мицелл, в которых в гидрофобном ядре, сформированном блоками полипропиленгликоля, находятся НЧ, а само ядро экранировано короной, сформированной блоками гидрофильного полиэтиленгликоля. Для стабилизации было решено использовать два типа плюроников: Pluronic F-127 и Pluronic F-68. Данные вещества различаются друг от друга по содержанию гидрофильных (x)-гидрофобных звеньев (y) в их структуре (x:y = 4 для F-68 и x:y = 2,3 для F-127). Получение стабильных водных коллоидных суспензий оказалось возможным только при использовании Pluronic F-127, что мы объясняем большей длинной гидрофобного фрагмента у данной молекулы, образовывать которого достаточно, чтобы прочные гидрофобные взаимодействия с НЧ, покрытыми олеиновой кислотой. НЧ<sub>куб</sub>, покрытые Pluronic F-127, обладали гидродинамическим размером в диапазоне 90-130 нм, в зависимости от размера исходных НЧ<sub>куб</sub> (Таблица 17). Значения Т2 релаксивности НЧ<sub>куб</sub> также были значительно выше, чем для НЧсф, достигая значений 367 мМ-1с-1 для НЧ<sub>куб</sub>-20, что делает их перспективными контрастными агентами для МРТ. Интересно отметить, что для НЧ<sub>куб</sub> значения T2 релаксивности увеличиваются с размером магнитного ядра И намагниченностью насыщения, однако для НЧ-куб происходит резкий спад значения T2 релаксивности до 135 мМ<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>. Мы связываем такое поведение с увеличением размеров и потерей агрегативной стабильности в высоких полях при измерении T2 релаксивности.

Таблица 17 – Физико-химические характеристики НЧ<sub>куб</sub>, стабилизированных Pluronic F-127

Образец	Т2-релаксивность,	Гидродинамический	ζ-потенциал, мВ
	мМ-1с-1.	размер после	
		конъюгации с Pluronic	
		F-127, нм	
НЧ <sub>куб</sub> -10	190	99±3	-11±3
НЧ <sub>куб</sub> -15	300	100±2	-13±2
НЧ <sub>куб</sub> -20	367	107±7	-12±4
НЧ <sub>куб</sub> -30	135	130±2	-11±2

Вторым подходом, используемым стабилизации водных ДЛЯ коллоидных суспензий, был подход с использованием В качестве стабилизаторов катехоламинов и их производных, конъюгированных с полиэтиленгликолем. За счет наличия соседних гидроксильных групп катехоламиновая группа способна образовывать прочные связи с поверхностью наночастиц магнетита, тогда как молекулы ПЭГ обеспечивают стерическую и электростатическую стабилизацию. В качестве катехоламинов нами был использован 6-нитродофамин. Также широкий выбор концевых группировок молекул ПЭГ позволяет контролировать процесс сборки отдельных магнитных В частности, использование ядер. гомобифункционального ПЭГ с концевыми карбоксильными группами позволяет обеспечить сшивку отдельных НЧкуб В более крупные конгломераты размером 130 нм. Вероятно, данный процесс происходит за счет сшивки аминогрупп 6-нитродофамин, иммобилизированных на различных наночастицах одной молекулой ПЭГ. При использовании гетеробифункционального ПЭГ с концевыми карбоксильными и метильной группировкой такой сшивки не происходит, что позволяет получать водные коллоидные растворы отдельных наночастиц с размером 20-30 нм.

#### Стабилизация НЧкл

Для получения водных коллоидных растворов НЧкл были использованы такие же подходы, как и для НЧкуб: 1) нековалентная стабилизация Pluronic F-127; 2) ковалентная стабилизация конъюгатом 6-нитродофамина с ПЭГ. В случае покрытия Pluronic F-127 размер полученных НЧ составляет 100 нм, тогда как покрытие 6-нитродофамином приводит к получению наночастиц с гидродинамическим диаметром около 140 нм. Для образцов НЧкл К1 и К14 было проведено исследование их динамических магнитных свойств после гидрофилизации сополимером Pluronic F-127. Значение параметра r2 для образца K2 составило 109 с<sup>-1</sup>·мМ<sup>-1</sup>, тогда как для образца K14 оно составило с<sup>-1</sup>·мМ<sup>-1</sup>. Более низкие значения 168 скорости r2-релаксации ДЛЯ синтезированных НЧкл, в сравнении с ранее полученными аналогичными значениями для других кластерных наночастиц, можно объяснить толщиной полимерной оболочки. Ранее было показано, что увеличение размера полимерной оболочки приводит к уменьшению значений r2 [302]. Pluronic F-127 имеет большую молекулярную массу (12500 Да) и размер, что, скорее всего, приводит к снижению значений r2. Тем не менее, значения r2 полученных НЧкл сопоставимы со значениями r2 коммерческих контрастных веществ на основе наночастиц оксида железа [263].

#### Стабилизация НЧст

Используемый нами синтез НЧст проводится в водной среде, таким образом, получаемые НЧ изначально имеют гидрофильную поверхность, что облегчает их поверхностную модификацию. Так как большая часть полученных НЧ, так или иначе, были стабилизированы Pluronic F-127 решено было и НЧст стабилизировать указанным полимером. Добавление Pluronic F-127 приводит к его сорбции на поверхности НЧ, с получением НЧ с гидродинамическим размером 100 нм и дзета потенциалом равным -19 мВ. Оценка динамических магнитных свойств коллоидных растворов НЧст *D-1* и

*N-1*, выявила невысокие значения скоростей r2-релаксации (14 и 51 с<sup>-1</sup>·мМ<sup>-1</sup>, соответственно). Высокая остаточная намагниченность НЧст, вероятнее всего, привела к частичной агрегации НЧст, что повлекло за собой снижение значений параметра r2.

#### Стабилизация ФКсф

Синтез ФК проводился в водной среде и получаемые при этом НЧ изначально обладают гидрофильной поверхностью, однако суспензия стабильна только при значениях pH 2-3. Для получения стабильного коллоидного раствора при физиологических значениях pH ФК были стабилизированы цитрат ионами.

Оценку среднего гидродинамического размера НЧ в растворе также осуществляли методом динамического светорассеяния (Рисунок 54). Из полученных численных значений видно, что НЧ стабильны в деионизированной воде и имеют средний гидродинамический размер немного больший, чем размер единичного магнитного ядра.



Рисунок 54 – Гидродинамические кривые коллоидного раствора образца ФКсф.

#### 2.5 Исследование токсичности НЧ в экспериментах *in vitro*

#### Исследование токсичности НЧ-СА в экспериментах in vitro

НЧ на основе оксидов железа давно исследуются в качестве потенциальных контрастных агентов, средств доставки лекарств и агентов для гипертермии, исследования механизма их токсичности были неоднократно проведены в различных исследовательских группах по всему миру. Основным механизмом токсического воздействия НЧ является окислительный стресс, возникающий при повышении концентрации ионов железа, приводящий к повреждению белков и ДНК клетки. Кроме непосредственно концентрации железа в составе НЧ в культуральной среды на жизнедеятельность клеток также могут влиять такие параметры НЧ, как их размер магнитного ядра, гидродинамический размер, форма и материал покрытия, при этом они могут напрямую влиять на жизнедеятельность клетки, так и опосредованно, за счет влияния, например на эффективность интернализации.

Поскольку для всех типов НЧ, кроме НЧ-СА не представляется возможным получение стабильных водных коллоидных суспензий без наличия ПЭГ в составе покрытия решено было исследовать его влияние на токсичность НЧ на примере НЧ-СА. Для этого нами были получены НЧ-СА, имеющие в своем составе одинаковые магнитные ядра, но различающиеся по количеству ядер в одной наночастице и соответственно гидродинамическому размеру НЧ. Для получения таких НЧ нами было произведено разделение реакционной смеси НЧ-СА после сшивки глутаровым альдегидом с помощью гель проникающей хроматографии на носителе Sepharose CL-4B. При этом было получено две фракции НЧ с гидродинамическим диаметром 36 (НЧ-СА-40) и 85 (НЧ-СА-80) нм (Таблица 18). Данные DLS также подтверждаются данными ПЭМ (Рисунок 55). Путем химической пришивки ПЭГ к наночастицам НЧ-СА-40 были получены ПЭГилированные НЧ (НЧ-СА-ПЭГ).

	Гидродинамический	Содержание	ζ-потенциал,
	диаметр, нм	белковой	мВ
		оболочки, масс.%	
НЧ-СА-80	85±10	28±3	-24±2
НЧ-СА-40	36±4	50±3	-35±3

Таблица 18 – Физико-химические характеристики НЧ-СА разного размера.



Рисунок 55 – ПЭМ микрофотография НЧ-СА-40 (А) и НЧ-СА-80 (Б)

Исследования токсичности наночастиц разного размера проводили на культурах фибробластов человека и глиобластомы человека U251 с использованием таких методов, как MTS и LDH теста, тогда как уровень АФК и фрагментации ДНК оценивали с использованием флуоресцентного красителя DCFDA и методом Комета теста соответственно.

Как LDH, так и MTS тест показали отсутствие значимого токсического эффекта вплоть до концентраций 10мМ. При концентрации 10мМ для HЧ-CA-ПЭГ наблюдалась снижение жизнеспособности клеток при инкубации в течение 48 часов и на культуре опухолевый клеток глиобластомы U251, но при этом в MTS тесте подобной зависимости выявлено не было. Наоборот, HЧ- СА-ПЭГ показали наименьшую токсичность при инкубации 48 часов на обеих клеточных культурах. Исследование формирования АФК при инкубации с НЧ показало, что НЧ-СА-ПЭГ обеспечивают наименьший уровень формирования АФК по сравнению с другими типами НЧ. Интересно отметить, что метод Комета-теста не показал существенного увеличения фрагментации ДНК во всех образцах кроме НЧ-СА-40 и при инкубации в течении 48 часов. Таким образом, можно заключить, что НЧ-СА показывают низкую токсичность, как на опухолевых, так и на здоровых клетках. Выраженную токсичность проявляют НЧ-СА-40 при инкубации 48ч в концентрации 10мМ, при этом основным механизмом клеточной гибели является формирование АФК с последующим повреждением ДНК.

### Исследование токсичности НЧкуб, НЧкл и НЧст в экспериментах in vitro.

Для исследования влияния формы наночастиц нами были получены НЧкуб, НЧст и НЧкл, с одинаковым размером кристаллита, а также стабилизированные одним и тем же полимером Pluronic F-127 (Таблица 19). Таблица 19 – Основные характеристики НЧ используемых для МРТ диагностики опухолей

Название образца	Покрытие наночастиц	Размер кристал лита, нм	Гидроди намичес кий размер, нм	Дзета- потен циал, мВ	Намагни- ченность насыще- ния, э.м.е/г	T2- релакси вность, мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
НЧкуб	Pluronic F127	15	100±2	-18.5	59	301,07
НЧст	Pluronic F127	20	101±5	-19.0	22	51.34
НЧкл	Pluronic F127	16	100±4	-12.0	80	109.41

Исследование проводили методом MTS теста на опухолевых и нормальных клеточных культурах. Полученные результаты свидетельствуют о низкой токсичности всех типов HЧ, при этом значения IC50 не превышали 200 мкг/мл, что позволяет их использовать в качестве контрастных агентов для MPT при внутривенном введении. Исследование формирования AФK с использованием флуоресцентного индикатора DCFDA не показало различий между контрольными клетками и клетками, инкубированными с HЧ. Также не было показано достоверных различий в уровне гибели клеток путем апопотоза и некроза после инкубации с HЧ.

Кроме того, для НЧкуб и НЧкл нами было исследовано их поведение при взаимодействии с клетками печени, так как именно в печени по литературным данным происходит наиболее активная аккумуляция НЧ после внутривенного введения. На культурах клеток печени Alexander, Huh7 и HepG2 оба типа наночастиц показали снижение жизнеспоспособности клеток до 70% при концентрации 100 мкг/мл. Интересно отметить, что, несмотря на одинаковый уровень токсического воздействия механизмы клеточной гибели существенно отличались. Инкубация всех трех линий печеночных клеток с НЧкуб или НЧкл только в течение 24 часов вызвали ранние признаки апоптоза. Связывание аннексина V с клетками свидетельствовало о транслокации фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной мембраны, что является одним из маркеров апоптоза. Кроме того, конфокальная микроскопия высокого разрешения ясно показала, что клетки, обработанные с IOкластерами, отображают характерные морфологические изменения апоптоза, такие как изменение формы клетки, фрагментация ядер, а также образование пузырей на цитоплазматических мембранах. Оценка активности каспазы-3 показала, что действительно обработка НЧкл индуцировала массивную активацию каспазы-3 в клетках HepG2, Huh7 и Alexander. Все эти факты позволили предположить именно апоптотический механизм гибели клеток во всех трех типах клеток при инкубации с НЧкл. Напротив, инкубация с НЧкуб приводила к незначительному или незначительному повышению активности

каспазы-3 в клетках Alexander и Huh7. Вместе с результатами окраски клеток аннексином V / пропидий йодидом, эти данные свидетельствуют, что НЧкуб запускают иной, по сравнению с апоптозом механизм гибели клеток у клеточных линий у Alexander и Huh7. Кроме того, митохондриальные функция и дисфункция стали ключевыми факторами в регуляция аутофагии. Таким образом, мы предположили, что нарушения в процессе аутофагии могут объяснить различия при запуске апоптоза НЧкуб и НЧкл в различных линиях клеток печени. Чтобы проверить, участвуют ли НЧкуб и НЧкл в образовании аутофагосом, было исследовано липидирование белка LC3. Образование конъюгата фосфатидилэтаноламина с белком - надежный индикатор аутофагии. Как показано, НЧкуб индуцируют эндогенную трансформацию LC3-II в клетках культуры Alexander и Huh7, но не в клетках HepG2. Интересно, что НЧкл не влияли на липидирование LC3. Тем не менее это не объясняет почему химически похожие НЧкуб и НЧкл вызывают разные реакции клеточной смерти в клетках Alexander и Huh7. Ранее было показано, что МНЧ-индуцированная аутофагия начинается на лизосомном уровне. Мы проанализировали, насколько НЧкуб и НЧкл приводят к отдельным лизосомным дестабилизациям в клеточных линиях печени. Действительно, воздействие как НЧкуб, так и НЧкл приводило к образованию больших набухших лизосом во всех линиях клеток, что указывает на лизосомную дестабилизацию.

#### Исследование токсичности ФКсф в экспериментах in vitro

Токсичность ФКсф также была исследована на опухолевых клеточных линиях, таких как линии аденокарциномы молочной железы мыши 4T1, карцинома толстой кишки мыши CT26, а также нормальной клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши SC-1. При инкубации в течение 48 часов не было обнаружено значительной клеточной гибели вплоть до концентрации 100 мкг/мл. Исследования продукции АФК показали, что лишь в единичных

клетках линии 4T1 усиливалась продукция АФК. Опираясь на морфологические признаки клеток, окрашенных флуоресцентным красителем DCFDA, можно сделать вывод, что данные клетки находились на стадии апоптоза – они были ошарены, зачастую рядом с этими клетками локализовались окрашенные апоптотические тельца. Аналогичные данные были получены для клеток линии CT-26, инкубировавшихся с ФК.

Окрашивание клеток линии 4T1 прижизненными флуоресцентными красителями из коммерческого набора по выявлению апоптоза/некроза в культуре показало, что в популяции клеток, инкубировавшихся в течение 15 минут с ФКсф, присутствуют лишь единичные клетки, проявляющие признаки раннего и позднего апоптоза (Рисунок 56).



Рисунок 56 – Выявление механизма гибели клеток в клеточных линиях 4T1, CT26 и SC-1 после 15-минутной инкубации с ФКсф без воздействия ПМП. маркировка клеток: красный – Apopxin Deep Red (маркер апоптоза), зеленый – Nuclear Green DCS1 (маркер некроза), синий – CytoCalcein Violet (витальный краситель). Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка 200 мкм

В аналогичных экспериментах для клеток линии СТ-26 было показано, что в популяции клеток инкубированных с ФКсф, наблюдалось большее по сравнению с культурой 4T1 количество клеток, находящихся на раннейпоздней стадиях апоптоза (Рисунок 56).

#### 2.6 Биораспределение НЧ после внутривенного ведения

Определение НЧ на основе сложных оксидов железа в биологических образцах является отдельной задачей, требующей специального решения. По сравнению с остальными переходными металлами, входящими в состав млекопитающих, железо является наиболее распространенным. В теле здорового человека содержится до 3,5 г железа. Среди основных соединений, содержащих железо, можно выделить гемоглобин крови, различные цитохромы и белки цепи передачи электронов, а также трансферрин переносчик железа и ферритин, выполняющий роль депо железа. В целом определение НЧ в органах по измерению концентрации железа представляется возможным, однако точность определения содержания НЧ в биологических тканях ограничена фоновым значением содержания железа в биологической ткани. Более чувствительным является метод МРТ, которые позволяет обнаруживать даже небольшие количества ферро- и суперпарамагнитных сигнал МРТ нелинейно материалов, но, к сожалению, зависит OT концентрации НЧ в ткани и позволяет проводить только качественную оценку наличия НЧ в исследуемом органе. Также существует возможность введения экзогенных меток в состав наночастиц, например радиоактивных или флуоресцентных. Данный метод является более чувствительным, чем прямое определение железа, но ограничен химической структурой НЧ, которая не всегда позволяет надежно включить метку в состав НЧ.

#### Биораспределение НЧ-СА после внутривенного введения

Для определения содержания НЧ-СА в органах после внутривенного введения нами было решено провести ковалентное связывание НЧ с радиоактивной меткой <sup>125</sup>I. Метка может быть введена за счет реакции электрофильного замещения в орто положение фенольного радикала аминокислоты тирозин, входящей в состав сывороточного альбумина.

Таблица 20 – Основные фармакокинетические параметры контрастного средства

	AUC $0 \rightarrow \infty$ ,	AUMC0→∞,	1.	Cl,	MRT,	Исс. п	T1/2,
	мг*ч∕кг	мг*ч <sup>2</sup> /кг	К	л/ч	Ч	v 88,JI	Ч
Тонкий кишечник	31.10	363.76	0.07	0.16	11.70	1.88	9.36
Желудок	96.44	1259.62	0.07	0.05	13.06	0.68	10.52
Мочевой пузырь	151.20	1293.76	0.15	0.03	8.56	0.28	4.59
Мышца бедренная	9.36	105.21	0.07	0.53	11.24	6.00	9.89
Кожа	121.73	1778.78	0.07	0.04	14.61	0.60	10.04
Кость	21.22	156.84	0.66	0.24	7.39	1.74	1.05
Сердце	18.69	231.55	0.06	0.27	12.39	3.32	10.78
Печень	189.31	2351.55	0.07	0.03	12.42	0.33	10.63
Почки	95.46	1529.67	0.05	0.05	16.02	0.84	13.00
Селезенка	65.13	837.64	0.06	0.08	12.86	0.99	11.53
Легкие	41.14	475.41	0.07	0.12	11.56	1.40	9.71
Мозг	3.14	51.64	0.05	1.59	16.45	26.20	12.86
Кишка	21.44	494.71	0.03	0.23	23.07	5.38	20.50
Кровь	61.90	663.14	0.07	0.08	10.71	0.87	9.69
Сыворотка	73.77	700.02	0.07	0.07	9.49	0.64	9.44

Проведя анализ полученных данных можно выявить основные органы, накапливающие контрастное средство. К таким органам можно отнести: печень, почки, селезёнку, а также кожную ткань и ткань желудка. По данным литературы печень и селезёнка являются основными органами, накапливающими контрастные средства на основе магнитных наночастиц. Однако накопление наночастиц в почках не является ожидаемым. Известно, что в процессе фильтрации в мочу попадают только низкомолекулярные вещества, тогда как даже белки не должны проникать в мочу. Однако в случае контрастного средства нами было отмечено значительное накопление препарата в моче. Одной из гипотез, объясняющих данный эффект, могла стать Однако, отсоединившийся гипотеза отрыва метки. йод преимущественно аккумулируется в щитовидной железе, а в данном органе спустя 24 часа было обнаружено не более 5% дозы, тогда как суммарное количество метки, выведенной с мочой, составило более 50%.

Также стоит отметить, что основным методом выведения контрастного средства является фильтрация через почки. Таким образом было выведено более 50% исходной дозы вещества. Дополнительно 7% было выведено с калом. В щитовидной железе также было обнаружено 7% от исходной введённой дозы. Однако накопление в щитовидной железе наиболее целесообразно связывать с неспецифическим отщеплением йода с белковой молекулы, которого невозможно избежать, используя данный метод анализа.

### Биораспределение НЧкуб, НЧкл и НЧст после внутривенного введения

Как было указано ранее, для НЧкуб, НЧкл и НЧст не удалось получить стабильные водные коллоидные растворы НЧ при стабилизации молекулами ЧСА, в связи с чем, были использованы НЧ, покрытые полимером плюроник F-127.

Концентрации железа в печени, селезенке, почках, легких и сердце измеряли с помощью АЭС у контрольных и получавших НЧ (5 мг/кг) животных без опухолей (Рисунок 57).

Через час после системного введения НЧ<sub>куб</sub> в основном захватывались печенью, затем легкими, хотя через 24 ч концентрация железа в легких

129

снижалась до нормального уровня. НЧ<sub>ст</sub> накапливались в легких, начиная с раннего периода времени, тогда как захват в печени был ниже, чем для НЧ<sub>куб</sub>. У мышей, получавших НЧ<sub>кл</sub>, уровень железа в печени повышался только через 24 ч после внутривенного введения, тогда как концентрация железа в легких не отличалась от контрольных животных.



Рисунок 57 – Содержание железа в органах после внутривенного введения НЧкуб, НЧст и НЧ кл

Для всех исследованных НЧ концентрация железа в селезенке была несколько выше (хотя и незначительной), чем у контрольной группы, не получавшей лечения, и ни одна из частиц не накапливалась в почках и сердце.

Известно, что опухоли влияют на васкуляризацию, морфологию и функцию органов за счет диссеминации раковых клеток и/или стимуляции созревания и рекрутирования клеток-супрессоров миелоидного происхождения. Например, у животных, несущих 4T1, вес селезенки был значительно выше по сравнению с контролем и животными с опухолевыми имплантатами CT26 ( $251 \pm 19$  мг,  $157 \pm 7$  мг и  $144 \pm 4$  мг соответственно). Следовательно, биораспределение НЧ может различаться между животными без опухоли и с опухолью. Чтобы проверить это, концентрацию железа измеряли у мышей с имплантированными опухолями 4T1, CT26 и B16 через 24 часа после инъекции НЧ. Качественно, полученные результаты не отличались между животными с опухолями и без, идентифицировав печень и селезенку в качестве первичного места накопления исследуемых НЧ. Следует отметить, что накопление HЧ<sub>ст</sub> в легких постоянно обнаруживалось во всех группах животных. Также между мышами BALB/с и C57BL/6 не было обнаружено различий в профилях биораспределения НЧ. Известно, что накопливаются в солидных опухолях EPR-зависимым образом. Чтобы изучить влияние EPR эффекта на накопление НЧ в опухолях, уровни железа были измерены в опухолях 4T1, CT26 и B16 через 24 часа после инъекции HЧ (Рисунок 58).



Рисунок 58 – Накопление НЧ в различных опухолях после внутривенного введения

Действительно, накопление НЧ при злокачественных опухолях зависело от типа опухоли (двусторонний ANOVA, p = 0,12) с максимальной эффективностью доставки НЧ в опухолях B16 (4,1% от введенной дозы) и минимальной в опухолях 4T1 (0,8% от введенной дозы) (непарный t-критерий, p = 0,036). Эффективность доставки  $H_{ky6}$ ,  $H_{cT}$  и  $H_{kn}$  для всех типов опухолей составила 3,79%, 2,94% и 1,21% от введенной дозы соответственно (двухсторонний ANOVA, p > 0,05).

### 2.7 Синтез и характеристика НЧ, несущих противоопухолевые препараты

### Синтез и характеристика НЧ-СА-ПЭГ, загруженных доксорубицином

Для получения наночастиц, способных доставлять противоопухолевый препарат Докс, было решено использовать НЧ-СА-ПЭГ, как наименее токсичные и наиболее стабильные. Молекулы СА, образующие оболочку НЧ-СА-ПЭГ, в физиологических условиях заряжены отрицательно (pI CA = 5.5) [43]. Таким образом, оболочка может связывать молекулы Докс, которые заряжены положительно при pH 7,4 (pKa = 8,3) [49], за счет комбинации электростатических взаимодействий с оболочкой НЧ-СА-ПЭГ и, возможно, взаимодействий антрациклиновых фрагментов лекарственного средства друг с другом, например,  $\pi$ -стэкинг. Этот механизм загрузки лекарственного средства имеет явное преимущество по сравнению ковалентной с иммобилизацией, поскольку он не изменяет химическую структуру лекарственного средства, что полностью сохраняет функциональную активность лекарственного средства. Также известно, что электростатическое взаимодействие сильно зависит от ионной силы в случае слабых оснований, таких как фрагмент аминогликана в Докс, и от рН, в случае слабых кислот, таких как карбоксильные группы в СА. Как показано далее, НЧ, загруженные Докс, остаются стабильными даже после инкубации в PBS. Однако эффективность связывания Докс снижается, а высвобождение Докс увеличивается при подкислении. Наши эксперименты демонстрируют, что частицы НЧ-СА-ПЭГ, нагруженные Докс, остаются стабильными И

практически не изменяют размер вплоть до содержания Докс равного 8% масс. Выше этой точки наблюдается увеличение как размера комплекса, так и значения PDI с 0,20 до 0,45 (Рисунок 59).



Рисунок 59 – Зависимость гидродинамического диаметра комплекса НЧ-СА-ПЭГ от величины загрузки Докс

дестабилизации Эффект может быть вызван нейтрализацией НЧ-СА-ПЭГ за счет поверхностного заряда увеличения количества, связанного с частицами Докс, несущего положительный заряд. Таким образом, было решено определить значение в 8% как оптимальную нагрузку Докс в НЧ-СА-ПЭГ и использовать это значение в дальнейших экспериментах. Для сравнения, было показано, что ковалентная сшивка Докс и НЧ может привести получению содержанием Докс 13.2% [50]. Согласно систем С к предложенному нами механизму иммобилизация молекул Докс за счет электростатических взаимодействий между Докс НЧ-СА-ПЭГ должна приводить к снижению дзета-потенциала MNP. Результаты показывают, что дзета-потенциал на поверхности НЧ увеличивается с увеличением процента Докс. Незагруженные частицы характеризовались нагрузки дзетапотенциалом -30 ± 3 мВ, тогда как загруженные НЧ-СА-ПЭГ с 8% содержанием Докс показывают немного более высокий дзета-потенциал равный -25 ± 1 мВ. Интересно отметить, что образец НЧ-СА-ПЭГ с 20% содержанием Докс имеет гораздо более высокий дзета-потенциал (-11 ± 1 мВ) по сравнению со значениями незагруженных наночастиц и НЧ-СА-ПЭГ с 8 % загрузки (Рисунок 60).



Рисунок 60 – Зависимость ζ-потенциала от количества Докс в комплексе НЧ-СА-ПЭГ

Дзета-потенциал увеличивается, вероятно, экранирования из-за отрицательного поверхностного заряда НЧ-СА-ПЭГ. В результате мы можем видеть уменьшение отталкивания между макромолекулярными компонентами, что приводит к агломерации и седиментации. В статье [51] было продемонстрировано увеличение дзета-потенциала ЧСАтакже наночастиц во время загрузки Докс. Наблюдались изменения от -43,3 ± 1,1 мВ до  $-33,1 \pm 2,6$  мВ. Более того, наблюдалось значительное увеличение диаметра загруженных Докс наночастиц CA: от 166,5 ± 17,6 нм в случае ненагруженных наночастиц до 379,5 ± 21,5 нм для наночастиц, загруженных лекарственным средством. Этот факт подтверждает, что наночастицы, нагруженные Докс, имеют тенденцию к увеличению и агломерации. Кроме того, нами было исследовано влияние различной ионной силы на загрузку Докс в НЧ-СА-ПЭГ. Концентрация свободного несвязанного Докс, высвобождаемого из НЧ-СА-ПЭГ, увеличивается с 0,025 до 0,048 мг / мл при увеличении ионной силы с 0,1 до 0,3 М (Рисунок 61).



Рисунок 61 – Зависимость концентрации свободного Докс в растворе НЧ-СА-ПЭГ от ионной силы

Экранирование поверхностных зарядов на НЧ-СА-ПЭГ И Докс ослабляет электростатические взаимодействия между макромолекулами и увеличивает высвобождение лекарства из НЧ-СА-ПЭГ. Кроме того, мы проанализировали высвобождение Докс при различной кислотности окружающей среды, чтобы подтвердить рН - зависимую эффективность полученного НЧ-СА-ПЭГ для доставки Докс. Известно, что кислотность среды в некоторых солидных опухолях повышается в результате гипоксии и последующего ацидоза. Согласно полученным данным, при рН 7,4 количество высвободившегося Докс не превышает 25% от веса исходного содержания лекарства в НЧ-СА-ПЭГ с емкостью загрузки 8%. В кислых условиях процесс идет быстрее, и при рН 6,5 и рН 5,5 через 25 ч полученные значения Докс составляют 55 и 75% соответственно. Мы полагаем, что протонирование отрицательно заряженных функциональных групп в СА снижает количество центров электростатического взаимодействия с положительно заряженными молекулами Докс. В результате молекулы Докс не могут больше связываться поверхностью НЧ-СА-ПЭГ, и этот факт объясняет более быстрое С высвобождение лекарства. Таким образом, НЧ-СА-ПЭГ, доставленный в ткань опухоли, может демонстрировать более быстрое высвобождение Докс в этой области, обеспечивая направленную и чувствительную к рН доставку лекарственного средства. Длительное высвобождение Докс из НЧ-СА-ПЭГ значениях рН также снижает побочные эффекты при нормальных противоопухолевых препаратов, связанные с высокими дозами лекарств во время традиционной химиотерапии. Кроме того, факт зависимости интенсивности высвобождения Докс значений pН OT является дополнительным доказательством наличия электростатических взаимодействий в НЧ-СА-ПЭГ между оболочкой из СА и Докс.

Для увеличения терапевтической эффективности наноструктурированных препаратов наряду со стимул чувствительным высвобождением лекарства популярным подходом является активная доставка за счет опухоль специфических лигандов. Одним из таких лигандов является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – белковая сигнальная молекула, активирующая неоангиогенез и гиперэкспрессированная на поверхности ряда опухолевых клеток, в частности аденокарциномы молочной железы. Для увеличения специфичности доставки к опухолевым клеткам аденокарциномы 4T1 мыши НЧ-СА-ПЭГ, загруженные доксорубицином, были дополнительно конъюгированы с моноклональными антителами к VEGF.

## Синтез и характеристика НЧ-СА, загруженных фотосенсибилизаторами бактериохлоринового ряда

Исходя из экспериментов, проведенных при изучении взаимодействия НЧ-СА-ПЭГ и доксорубицина, нами были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что нековалентная загрузка препаратов на наночастицы будет достигаться в случае наличия в структуре препарата гидрофобного фрагмента и положительно заряженной группы. Данная комбинация позволяет достичь высокой степени сродства к поверхности сывороточного альбумина за счет комбинации гидрофобных взаимодействий между препаратом и гидрофобными карманами в структуре сывороточного альбумина и электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными группами на поверхности белка и положительно заряженными группами в структуре препарата. Также стоит отметить, что человеческий сывороточный альбумин обладает высоким сродством к ксенобиотикам, и большое количество лекарственных препаратов переносится по организму в связанном виде. Одним ИЗ перспективных подходов является фотодинамическая терапия (ФДТ). Данный метод основан на использовании веществ фотосенсибилизаторов (ФС), способных генерировать активные формы кислорода  $(A\Phi K)$ под действием света. ΑФК являются высокореакционными формами радикальными кислород содержащих молекул, способными вызывать мощный окислительный стресс, приводящий к гибели клеток. При этом, в отсутствии светового излучения, такие ФС проявляют существенно более низкую токсичность. Метод ФДТ основан на внутривенном введении ФС пациенту, мониторингом максимума его накоплении в опухоли и последующем облучении опухоли в момент максимума накопления ФС. Одной из проблем ФДТ терапии является ограниченность ее применения для глубоко залегающих опухолей, что обусловлено низкой проникающей способностью света через человеческие ткани. Вторая, менее очевидная проблема, заключается в механизме противоопухолевого действия и детекции накопления ФС. Как правило, большинство ФС обладают также флуоресцентными свойствами, что позволяет проводить ИХ мониторинг В путем измерения тканях флуоресценции, но и испускание кванта света за счет флуоресценции и формирование синглетного кислорода происходят при поглощении кванта возбуждающего излучения, что приводит к конкуренции за квант света между двумя процессами, а следовательно, чем более выраженный терапевтический эффект оказывает ФС, тем меньше его диагностический потенциал как флуорофора. Третья проблема высокой гидрофобностью связана с используемых для ФДТ молекул и их низкой растворимостью в воде, что требует использования систем доставки для создания лекарственных форм.

Использование в качестве носителей магнитных наночастиц позволяет решить одновременно все эти проблемы:1) метод МРТ позволяет получать изображения всего объема человеческого тела и не ограничен глубиной проникновения, следовательно можно неинвазивно определить a максимальное время накопления ФС путем анализа накопления НЧ методом МРТ, а непосредственно терапию даже глубокозалегающих тканей проводить, низкоинвазивные хирургические вмешательства используя или С использованием гибких световодов; 2) метод МРТ использует радиоволновые частоты электромагнитного спектра и НЧ могут быть визуализированы за счет своих магнитных свойств, что позволяет использовать ФС с очень низкими квантовыми выходами флуоресценции и высокими выходами синглетного кислорода; 3) используемые для покрытия молекулы ЧСА могут эффективно солюбилизировать гидрофобные молекулы ФС, тем самым увеличивая его растворимость в воде.

В качестве потенциального ФС нами были выбраны производные бактериохлорина *a*, дополнительно несущие аминогруппу. В исходном виде эти производные нерастворимы в воде, тогда как НЧ-СА-ПЭГ, наоборот, проявляют тенденцию в агрегации и потере коллоидной устойчивости в органических неполярных растворителях. Для решения этой задачи нами был произведен подбор состава растворителя, который позволял избежать агрегации, как НЧ, так и ФС. На основе экспериментальных данных нами был выбран растворитель диметилсульфоксид (ДМСО) для ФС, а загрузку препарата производили путем добавления водного раствора НЧ-СА-ПЭГ и дальнейшей очистки от избытка ДМСО путем гель-фильтрации. Постепенное разбавление ДМСО водным раствором повышает полярность среды и приводит к смещению равновесия между свободной формой ФС, находящейся в растворе в сторону связанной с поверхностью альбумина на поверхности НЧ формы ФС. При этом за счет плавного изменения данного показателя не происходит резкой смены полярности среды и агрегации ФС с потерей своих свойств. Полученные НЧ-СА-ПЭГ-ФС обладают гидродинамическим размером 88 нм, а емкость загрузки равна 43%.

При использовании метода МРТ для диагностики контрастный сигнал создается за счет магнитных НЧ, а не напрямую ФС, поэтому необходимо подтвердить, что молекулы ФС не отделяются от поверхности НЧ и вся система существует в одной среде, как единое целое. Для этого нами были получены ФС, координирующие атом меди в своем макроцикле. В отличие от обычных ФС, содержащих только атомы С, Н, О, N такие молекулы легко идентифицировать с помощью метода ПЭМ, совмещенного с энергодисперсионным элементным картированием (Рисунок 62).



Рисунок 62 – Элементное картирование НЧ-СА-ПЭГ, несущих ФС в темнопольном режиме для Cu (A), Fe (Б), C (В), Fe и Cu (Г)

При изучении НЧ-СА-ПЭГ, несущих молекулы ФС с атомом меди, была показана четкая локализация сигнала от атомов меди с сигналом от железа, входящего в состав наночастиц. Кроме этого, сигнал от атомов меди локализовался с сигналом от азота, которых входит в состав, как самого ФС, так и белковой оболочки наночастиц. Таким образом, можно сделать вывод о прочной иммобилизации молекул ФС на НЧ-СА-ПЭГ.

## 2.8 Исследование эффективности НЧ-СА, загруженных противоопухолевыми препаратами *in vitro*

# Исследование эффективности НЧ-СА, загруженных доксорубицином *in vitro*

После конъюгации НЧ-СА-ПЭГ с антителами к VEGF методами конфокальной сканирующей микроскопии и проточной цитометрии нами было подтверждено увеличение специфичности связывания НЧ-СА-ПЭГ-VEGF с клетками аденокрациномы молочной железы мыши 4T1. Результаты конфокальной микроскопии показали, что НЧ-СА-ПЭГ-VEGF способны эффективно связываться с мембраной клеток 4T1 в отличии от НЧ-СА-ПЭГ IgG (Рисунок 63).



Рисунок 63 – Флуоресцентные фотографии клеток 4T1 после взаимодействия с HЧ-CA-ПЭГ-VEGF (верхняя панель) и HЧ-CA-ПЭГ-IgG (нижняя панель). А

совмещенное изображение, Б – флуоресценция DAPI, В – флуоресценция иммуноглобулинов козы, специфичных к иммуноглобулинам мыши

Исследование накопления Докс в ядре клеток также показало, что НЧ-СА@Докс-VEGF способствуют наиболее эффективному проникновению Докс в клетки и накоплению в ядре. После инкубации НЧ-СА@Докс-VEGF с клетками в ядре наблюдается разгорание флуоресценции Докс, что является характерной картиной при связывании Докс с ДНК (Рисунок 64). При этом максимум флуоресценции наблюдается через 35 минут после добавления НЧ-СА@Докс-VEGF в среду и интенсивность флуоресценции от Докс в ядре клеток достоверно выше в случае инкубации клеток с НЧ-СА@Докс-VEGF по сравнению с НЧ, неконъюгированными с антителами, или конъюгированными с неспецифическими антителами.



Рисунок 64 – Процесс интернализации Докс в живых клетках 4T1 после инкубации с НЧ-СА-ПЭГ-VEGF, загруженными Докс и их невекторными аналогами. Масштаб – 20 мкм

### Исследование эффективности НЧ-СА-ПЭГ, загруженных ФС in

vitro

Механизм противоопухолевого действия фотосенсибилизаторов основан на формировании АФК при воздействии светового излучения. К преимуществам данного подхода можно отнести отсутствие необходимости доставки лекарственного препарата непосредственно внутрь клетки и тем более связывания лекарства с внутриклеточными структурами, так как выделяемые при облучении АФК являются высокотоксичными, легко проникают сквозь клеточные мембраны и повреждают липиды, белки и ДНК клеток, даже если фотосенсибилизатор находится вне клетки. К недостаткам данного подхода стоит отнести риск потери фотодинамической активности при иммобилизации молекул на поверхности НЧ, за счет межмолекулярного взаимодействия и π-стекинга ароматических колец.

Взаимодействие НЧ-СА@ФС с опухолевыми клетками сначала было изучено с помощью конфокальной микроскопии. Исследование проводилось на двух клеточных линиях: 4T1рака груди мышей и CT26 рака кишечника мышей. Клетки инкубировались с НЧ-СА@ФС в течении 60 минут. Исследование показало, что все комплексы НЧ-СА@ФС накапливаются в опухолевых клетках и сохраняют способность к флуоресценции (Рисунок 65).

Далее была изучена индуцированная светом цитотоксичность, чтобы выяснить сохраняет ли ФС способность к генерации синглетного кислорода. Также была изучена темновая цитотоксичность, что бы выяснить насколько полученные комплексы биосовместимы и не вносят ли МНЧ вклад в цитотоксичность (Таблица 21 - Таблица 22).



Рисунок 65 – Конфокальная микроскопия клеток 4T1 (A-B) и CT26 (Г-Е) после инкубации с HЧ@ФС в течении 60 минут. HЧ-CA@ФC4 (A, Г); HЧ-CA@ФC6 (Б, Д); HЧ-CA@ФC8 (B, E)

Все три комплекса НЧ-СА@ФС проявили фотоиндуцированную цитотоксичность, зависящую от времени инкубации, при этом ненагруженные МНЧ не проявили цитотоксичность при облучении светом. При испытаниях на клетках СТ26 фотоцитотоксичность уменьшается в ряду НЧ-СА@ФС8 > НЧ-СА@ФС6 > НЧ-СА@ФС4, в случае с клетками 4T1 НЧ-СА@ФС4 > НЧ-СА@ФС6 > НЧ-СА@ФС8. Для всех соединений максимальная

фототоксичность достигается при инкубации клеток с МНЧ@ФС в течение 2 часов. Среди всех комплексов лучшее соотношение между темновой и фотоиндуцированной цитотоксичностью продемонстрировал комплекс НЧ-СА@ФС4. Для клеток 4T1 значение IC<sub>50</sub> при отсутствии облучения светом в почти в 60 раз выше, чем при облучении. Для НЧ-СА@ФС6 и НЧ-СА@ФС8 значение IC<sub>50</sub> при исследовании темновой цитотоксичности больше в 22 и 19 исследовании фотоиндуцированной токсичности. раз, чем при соответственно. При этом НЧ-СА@ФС4 продемонстрировали наименьшую цитотоксичность на обеих клеточных линиях. Суммируя полученные результаты, мы можем утверждать, что иммобилизации ФС на поверхность МНЧ позволяет получить высокоэффективные водорастворимые ФС, при этом фотоактивность ФС сохраняется.

Таблица 21 – Фотоиндуцированная и темновая цитотоксичность МНЧ@ФС на культуре клеток СТ26

IC <sub>50</sub> , нг/мл						
Время	30 мин	2ч	4ч	темновая		
инкубации						
НЧ-СА@ФС4	195±9	70±4	44±3,5	2783±39		
НЧ-СА@ФС6	57±3	54±4,5	49±2	1093±35		
НЧ-СА@ФС8	95±7	65±4	58±4,5	1042±17		

Таблица 22 – Фотоиндуцированная и темновая цитотоксичность НЧ-СА@ФС на культуре клеток 4Т1

IC50, нг/мл						
Время	30 мин	24	44	темновая		
инкубации						
МНЧ@ФС4	264±12	236±9	206±10	5113±29		
МНЧ@ФС6	198±11	69±5	67±4	4063±35		
МНЧ@ФС8	69±6	55±4	51±3	3085±24		
# 2.9 Исследование эффективности магнитной гипертермии (МГТ) с использованием ФК *in vitro*

Для выявления действия МГТ при 42-43 °C, 46-48 °C и 58-60 °C на опухолевые (4T1 и CT26) и нормальные (SC-1) клетки использовали Арорхіп Deep Red (маркер апоптоза) для прижизненной детекции фосфатидилсерина (ФС) на наружном листке клеточной плазматической мембраны. Ядра клеток с нарушенной проницаемостью плазматической мембраны и цитоплазму живых клеток окрашивали Nuclear Green DCS1 (маркер некроза) и CytoCalcein Violet (витальный краситель), соответственно. Перенос ФС из внутреннего листка клеточной плазматической мембраны во внешний является общим Однако признаком апоптоза. появляется все больше свидетельств неапоптотической экстернализации ФС. Было установлено, что перенос ФС во внешний листок происходит во время некроза до выявляемых изменений целостности плазматической мембраны. Следует отметить, что в случае апоптоза ФС воздействие на внешний листок происходит в течение нескольких часов, в то время как неапоптотические пути гибели клеток требуют от нескольких секунд до минут. Нарушение проницаемости клеточной плазматической мембраны является классическим признаком некротической гибели клеток. Таким образом, окрашивание клеток описанными красителями позволяет выявить в популяции мертвые и живые клетки и оценить тип гибели клеток. Только несколько клеток 4T1, CT26 и SC-1 были помечены красителями апоптоза и некроза после 15-минутной инкубации с ФКсф в СО2-инкубаторе (Рисунок 66). При этом большинство клеток положительно окрашивались витальным красителем, что свидетельствует об их жизнеспособности. Такие же результаты были получены для клеток, инкубированных в культуральной среде или DPBS в течение 15 минут воздействия ПМП. Следовательно, ни ФКсф, ни ПМП сами по себе не вызывали гибели клеток. Интересно, что МГТ при 42-43 °С в течение 15 минут также приводила к очень ограниченному окрашиванию

красителями на апоптоз и некроз во всех исследованных клеточных линиях (Рисунок 66), в то время как подавляющее большинство клеток окрашивалось витальным красителем.



Рисунок 66 – Выявление механизма гибели клеток в клеточных линиях 4T1, CT26 и SC-1 после 15-минутной инкубации с МНЧ без воздействия ПМП и после МГТ при различных температурах. Маркировка клеток: красный – Apopxin Deep Red, зеленый – Nuclear Green DCS1, синий – CytoCalcein Violet. Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка 200 мкм

Нагревание при 46–48 °C приводило к переносу ФС с внутреннего листка клеточной плазматической мембраны на наружный у значительной части клеточной популяции (Рисунок 66). Количество клеток, помеченных Nuclear Green DCS1, увеличилось по сравнению с таковым, вызванным легкой МГТ. При этом многие клетки были живыми, о чем свидетельствует их положительное окрашивание CytoCalcein Violet. В случае МГТ при 58–60 °C 100% клеток (культуры 4T1, CT26 и SC-1) окрашивались как Арорхіп Deep Red, так и Nuclear Green DCS1, при этом жизнеспособные клетки не обнаруживались (Рисунок 66).

Таким образом, наши результаты показывают, что МГТ при 42–43 °С не приводит к немедленной гибели клеток, тогда как МГТ при 46–48 °С приводит к активации апоптоза или раннего некроза у большей части популяции сразу после лечения. Нагревание при 58–60 °С вызывает некроз всей клеточной популяции.

Далее для анализа влияния МГТ на клетки проводили прижизненное окрашивание DCFDA. Повышение продукции активных форм кислорода (АФК) наблюдалось редко во всех исследованных клеточных линиях, инкубированных с НЧсф в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Рисунок 67). Основываясь на морфологических особенностях положительно меченых клеток (круглая форма с апоптозными тельцами), можно предположить, что клетки подвергались апоптозу. МГТ при 42–43 °C и 46–48 °C вызывала значительную активацию продукции АФК у клетки сразу после нагревания. Активации продукции АФК после МГТ при 58–60 °C не происходило (Рисунок 67). Таким образом, этот результат подтверждает, что нагревание клеток при высоких температурах приводит к быстрой гибели клеток.



Рисунок 67 – Выявление продукции АФК в клетках 4T1, CT26 и SC-1 после 15 мин инкубации с ФКсф без воздействия ПМП и после МГТ при разных температурах. Прижизненное окрашивание клеток DCFDA. Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка 200 мкм

### 2.10 Исследование противоопухолевой активности НЧ

#### Исследование противоопухолевой активности НЧ-СА@Докс-VEGF

Для исследования противоопухолевой активности нами были получены и охарактеризованы НЧ-СА-ПЭГ, загруженные противоопухолевым препаратом доксорубицином и конъюгированные с моноклональными антителами к фактору роста эндотелия сосудов (НЧ-СА@Докс-VEGF). Противоопухолевая терапия исследовалась в экспериментах in vivo на модели аденокарциномы молочной железы 4T1, а эффективность доставки оценивали с помощью МРТ. На МРТ снимках можно отметить значительное уменьшение интенсивности в области соответсвующей периферии опухоли через 24 часа после введения НЧ-СА@Докс-VEGF F, тогда как для остальных групп животных подобного эффекта не было отмечено (Рисунок 68).



Рисунок 68 – T2\* взвешенные МРТ-изображения мышей, с опухолью 4T1, до и через 24 ч после в/в введения НЧ-СА@Докс-VEGF (А,Б), НЧ-СА@Докс-ПЭГ-IgG (В,Г) и НЧ-СА@Докс-ПЭГ (Д.Е)

Кривые выживаемости показывают, что медиана выживаемости в контрольной группе составляет 25,5 дней, тогда как для группы, получавшей терапию НЧ-СА@Докс-VEGF данное значение равнялось 39 дням, что примерно в 1,5 раза больше, чем в контрольной группе (Рисунок 69).



Рисунок 69 – График выживаемости животных Каплана-Мейера в условиях терапии аденокарциномы молочной железы 4T1 с помощью комплексов магнитных наночастиц с доксорубицином

## Исследование противоопухолевой активности НЧ-СА-ПЭГ загруженных ФС

Для исследования корреляции между сигналом на МРТ от частиц и оптическим сигналом от ФС животным с привитой опухолью СТ26 вводили 7 мг/кг НЧ-СА@ФС и визуализировали с помощью МРТ и IVIS для

обнаружения НЧ и ФС соответственно. Оба метода показали глубокое накопление комплексов НЧ-СА@ФС во всех исследованных опухолях (Рисунок 70).



Рисунок 70 – Репрезентативные МРТ изображения(левая колонка) и флуоресцентная визуализация (правая колонка) мышей, несущих СТ26 опухоли до (А, Б) и через 4 часа после (В,Г) внутривенного введения НЧ-СА@ФС. Границы опухоли отмечены красным цветом

Примечательно, что данные МРТ контрастирования НЧ коррелировали с интенсивностью флуоресценции ФС в опухолях. Видно, что накопление НЧ в обеих опухолях приводит к значительному снижению интенсивности сигнала за счет Т2-контрастных свойств НЧ. Одновременно мы можем видеть увеличение интенсивности флуоресценции от участков опухоли, поэтому мы можем сделать вывод, что оба метода показывают накопление МНЧ и ФС в одной и той же опухоли и в одно и то же время.

Динамика накопления НЧ-СА-ПЭГ загруженных ФС (НЧ-СА@ФС) в опухолях изучалась с помощью МРТ (Рисунок 69). Известно, что НЧ действуют как контрастные агенты для Т2 МРТ, сокращая время релаксации T2 в тканях-мишенях, что приводит к снижению интенсивности сигнала. На T2-взвешенных изображениях область опухоли до лечения была отчетливо видна как гиперинтенсивная структура овальной формы (Рисунок 69А). Наблюдалось резкое увеличение интенсивности сигнала в опухолях на 1 и 4 ч после в/в инъекции, что свидетельствует о накоплении НЧ-СА@ФС (Рисунок 69 Б, В.). Через 24 ч опухолевые ткани все еще контрастировались, но гораздо меньше, чем в ранние сроки (Рисунок 69Г).



Рисунок 69 – Репрезентативные Т2-взвешенные изображения подкожных опухолей СТ26 (красные стрелки) до (А) и через 1 ч (Б), 4 ч (В) и 24 ч (Г) после внутривенного введения. введение МНЧ-СА@ФС

Чтобы проверить, можно ли использовать МРТ для неинвазивного отслеживания накопления МНЧ в опухолях, мы использовали метод АЭС для измерения концентрации железа в опухолях и органах до и через 1–24 ч после введения НЧ-СА@ФС. После вычитания концентрации эндогенного железа, измеренной в контрольной (нелеченой) группе, и нормализации данных по массе органов данные были нанесены на график в виде процента введенной дозы на грамм ткани (Рисунок 70).



Рисунок 70 – Распределение железа по органам после внутривенного введения НЧ-ЧСА@ФС

Максимальная концентрация железа для всех исследованных образцов была обнаружена через 1 ч после в/в введения. Как и ожидалось, печень и селезенка вмещали большую часть введенной дозы. Следует отметить, что %введенной дозы/г в опухолях через 1ч был сравним с значение в печени (129  $\pm$  11 % от введенной дозы/г и 120  $\pm$  25 % от введенной дозы/г), что указывает на значимое накопление МНЧ в опухолях СТ26. Через 4 ч концентрация железа снижалась в печени, селезенке и опухолях и оставалась постоянной вплоть до 24 ч после в/в введения. Чтобы снизить концентрацию эндогенного

железа животных перфузировали, что позволяет утверждать, что высокая концентрация железа через 1 ч после внутривенного введения была вызвана накоплением циркулирующих НЧ-СА@ФС. Общие результаты АЭС коррелировали с МРТ через 1 час и 24 часа в сутки, что указывает на то, что МРТ можно использовать для прогнозирования пика накопления в опухолях.

Накопление ФС в опухоли измеряли двумя независимыми методиками: FLS и IVIS. Оба метода продемонстрировали сходную тенденцию интенсивности флуоресценции в течение периода наблюдения с пиком накопления через 1-2 часа после инъекции, а затем с постепенным снижением до фонового уровня через 24ч. Что наиболее важно, профиль доставки ФС в опухолях соответствовал динамике накопления МНЧ (Рисунок 71), что позволяет предположить, что МНЧ и ФС вели себя как единый комплекс in vivo и вместе доставлялись к месту опухоли.



Рисунок 71 – Накопление ФС в опухоли СТ26 после в/в инъекции

НЧ-ЧСА@ФС

Этот результат очень важен для валидации МРТ как диагностического метода для прогнозирования пика накопления лекарств в опухолях, что, в свою очередь, имеет решающее значение для планирования ФДТ.

Наконец, чтобы доказать, что НЧ-ЧСА@ФС можно использовать в качестве тераностического инструмента для определения по МРТ пика накопления препарата в злокачественных тканях для проведения ФДТ данным МРТ и оптической визуализации были выбраны три временные точки с оптимальным (1 ч) и субоптимальным (30 мин, 240 мин) накоплением препарата в опухоли СТ26. Мыши, получавшие НЧ-СА@ФС без облучения, служили контролем (Рисунок 72).

В течение первой недели после лечения у всех животных, получавших ФДТ, наблюдалось замедление роста опухоли по сравнению с контрольной группой.



Рисунок 72 – Динамика роста опухоли СТ26 после ФДТ на различные сроки после внутривенного введения НЧ-СА@ФС

Так, на 7-е сутки у мышей, облученных через 30 и 60 мин после введения НЧ-СА@ФС, опухоли не обнаруживались, тогда как в группе 240 мин и контрольной группе размер опухоли составлял 110± 11 мм<sup>3</sup> и 286±32 мм<sup>3</sup> соответственно (р < 0,05). Однако, начиная с 10-го дня, у животных, получавших ФДТ через 240 мин после в/в введения, наблюдался рост опухоли. Обе группы, облученные вскоре после введения препарата (через 30 и 60 мин), продемонстрировали выраженное ингибирование роста опухоли в течение наблюдения по сравнению с контрольной группой. Хотя периода существенных различий в кинетике роста опухоли между 30-минутной и 60минутной группами не было, в первой группе рецидив был обнаружен на 14-й день, тогда как во второй все животные были свободны от опухолей до 22-го дня. В группе, облученной через 240 мин был обнаружен более высокий объем опухоли (998 $\pm$ 72 мм<sup>3</sup>) по сравнению с группами 30 мин и 60 мин (р <0,05). Однако объем опухоли в группе 240 мин все же был меньше, чем в контроле (1598±133 мм<sup>3</sup>; р <0,05). В целом полученные результаты подтверждают НЧ-СА@ФС принцип использования В качестве тераностического инструмента для улучшения ФДТ.

#### Исследование противоопухолевой активности ФКсф

Для исследования эффективности МГТ в качестве противоопухолевой терапии in vivo МНЧ были введены внутриопухолево, что приводит к их равномерному распределению по всему объему опухоли. Три цикла гипертермии при 42–43 °C приводили к достоверному уменьшению объема опухолей 4T1 по сравнению с контрольными группами. Однако через 20 дней после терапии (28 дней после имплантации опухоли) большинство опухолей рецидивировали. Медиана выживаемости обработанных животных была выше (43 дня после имплантации опухоли) по сравнению с животными, которым вводили DPBS (36 дней; долгосрочный тест, p<0,05) или МНЧ без последующего воздействия АМФ (37,5 дней; долгосрочный тест, P<0,05). Хотя МГТ при 42–43 °C вызывала полную регрессию опухолей СТ26 и 100% выживаемость (Рисунок 73).



Рисунок 73 – Эффективность МГТ при 42–43 °С для противоопухолевой терапии 4T1 и CT26 in vivo. Динамика роста опухоли после подкожной имплантации опухолевых клеток 4T1 (А) или CT26 (Б) мышам линии BALB/с. Общая выживаемость мышей 4T1- (В) и CT26 (Г) после МГТ

Даже одного цикла МГТ было достаточно для достижения результата. Эта доза нагревания не приводила к потере веса животных или каким-либо признакам заболевания. Затем мы изучили терапевтический ответ на более высокие дозы нагрева у мышей, несущих 4T1. Режимы 46–48 °C и 58–60 °C полностью ингибировали рост первичной опухоли (Рисунок 74).

157



Рисунок 74 – Эффективность МГТ при 46–48 °C и 58-60 °C для противоопухолевой терапии 4T1 in vivo. Динамика роста опухоли 4T1 после МГТ при температуре 46–48 °C (А) или 58-60 °C (Б). Общая выживаемость мышей после МГТ при температуре 46–48 °C (В) или 58-60 °C (Г)

Прогревание опухолей при 46-48 °С обеспечило 25% отдаленную выживаемость, а режим 58–60 °C – 40% (Рисунок 74). Важно, что гипертермия при 58-60 °C провоцировала потерю массы тела с максимальным значением (11%) на 7-е сутки после нагревания, а вес мышей нормализовался только через 20 суток после начала терапии. Более того, нами было обнаружено нарушение подвижности нижних конечностей со стороны опухоли, в ряде случаев до хромоты животных. Это явление может быть связано с термической коагуляцией мышц конечностей. Потеря массы тела после прогрева при 46-48 °C была незначительной (максимум 3,7%) и признаков повреждения мышц не наблюдалось. Стоит отметить, что инъекция DPBS (как и внутримышечное введение МНЧ без воздействия АМФ) не влияла на рост Ha выживаемости. опухоли И показатели основании данных 0

158

противоопухолевой активности и токсичности in vivo можно сделать вывод, что три цикла МГТ при 46–48 °С являются оптимальным режимом нагрева для опухолей 4T1, в то время как опухоли CT26 могут быть эффективно излечены за один цикл МГТ при 42-43 °C. Следует учитывать, что 4T1 является высокометастатической моделью и выживаемость животных определяется вторичным, а не первичным ростом опухоли. Действительно, как упоминалось выше, МГТ при 46-48 °C и 58-60 °C необратимо ингибировала первичные опухоли, в то время как в конечном итоге выжило только 25–40% животных. Большинство животных были выведены из эксперимента из-за нарушения дыхания, снижения активности и потери массы тела – симптомов, свидетельствующих о диссеминации метастазов 4Т1. Вскрытие подтвердило рост вторичных опухолей в легких этих животных. Отдельно было исследовано влияние МГТ первичной опухоли на метастатическую активность 4Т1. Для изучения диссеминации метастазов эксперименты с МГТ были проведены на мышах, которым была привита опухоль 4T1-luc. Эти экспрессируют белок клетки стабильно люциферазу, что позволяет обнаруживать опухоли с помощью системы визуализации in vivo за счет биолюминесеценции введения люциферина. Отдельно было после подтверждено, что опухоли 4T1-luc имеют такую же скорость роста, как и опухоли 4T1, не несущие ген люциферазы. Было показано, что через 29 дней после введения клеток у всех мышей контрольной группы в грудной клетке наблюдался сигнал от клеток 4T1-luc (Рисунок 75).



Рисунок 75 – Ингибирование распространения метастазов у мышей, получавших МГТ при 46–48 °C или после хирургического удаления. Репрезентативные изображения метастазов 4T1-luc в легкие у мышей через 29 дней после имплантации опухоли: (верхний ряд) мыши, которым вводили НЧ без последующего воздействия ПМП (n = 3), (средний ряд) мыши, которым вводили НЧ и проводили три цикла МГТ (n = 7), (нижний ряд) мыши после хирургического удаления первичной опухоли (n = 7)

Однако только у 43% животных, получавших МГТ при 46–48 °С, были метастазы в легких (Рисунок 75). Интенсивность свечения метастазов 4T1-luc у мышей контрольной группы была выше, чем у животных, получавших МГТ (10<sup>7</sup> имп/сек/см<sup>2</sup>/ср против 10<sup>5</sup>, соответственно), что указывает на увеличение опухолевой нагрузки. Результаты свидетельствуют о том, что МГТ ингибирует распространение метастазов 4T1. Этот эффект может быть обусловлен уменьшением массы первичной опухоли при МГТ и/или ингибированием роста вторичных опухолей. Чтобы различить эти два механизма, мы сравнили эффективность лечения опухоли 4T1 с помощью

160

МГТ с хирургическим удалением опухоли на той же стадии роста (8-й день после имплантации). Интересно, что в то время, как МГТ излечила все первичные опухоли, операция привела к рецидиву 28% опухолей. Метастазы после МГТ выявляли реже, чем после хирургического удаления (3/7 против 6/7 мышей соответственно) (Рисунок 75).

# 2.11 Исследование эффективности контрастирования опухолей методом MPT с использованием НЧ

## Исследование влияния размера НЧ на эффективность контрастирования

Размер НЧ является важным параметром, определяющим их поведение после введения в организм. При этом МНЧ являются существенно более сложным объектом для изучения этого параметра по ряду причин: 1) магнитные свойства находятся в зависимости от размеров магнитного ядра и изменение этого параметра неизбежно влечет за собой изменение магнитных свойств; 2) узкий диапазон стабильности водных суспензий единичных наночастиц приводить к ограничениям в использовании НЧ более 30-40 нм; 3) при стабилизации единичные МНЧ склонны к агрегации внутри одной НЧ, что также приводит к изменению их магнитных свойств. Для исследования влияния именно размера нами было решено сравнить эффективность контрастирования опухоли С6 головного мозга с помощью МРТ при использовании НЧ-СА-40 и НЧ-СА-80 (Рисунок 76).



Рисунок 76 – МРТ изображения в режиме SWI после введения НЧ-СА-40 (верхний ряд) и НЧ-СА-80 (нижний ряд) в дозе 5 мг/кг

Как видно из представленных изображений, оба типа НЧ проникают в ткань опухоли уже через 5 минут после внутривенного введения, при этом НЧ-СА-40 проявляют более ярко выраженную контрастирующую способность и остаются в ткани опухоли даже спустя 30 минут после введения, тогда как после введения НЧ-СА-80 через 30 минут изображение выглядит также как до введения контрастного препарата.

# Исследование влияния формы НЧ на эффективность контрастирования

Для оценки влияния формы НЧ на эффективность контрастирования было решено сравнить между собой НЧкуб, НЧкл и НЧст. Все три типа НЧ были стабилизированы покрытием на основе плюроника F127, чтобы исключить влияние строения оболочки на эффективность контрастирования. Следующие исследования МРТ были выполнены для оценки контрастных свойств НЧкуб, НЧкл и НЧст. in vivo. Опухоли 4T1, CT26 и B16 визуализировали до и после системной инъекции НЧ (5 мг/кг). Каждое животное сканировали с использованием режима T2, а затем опухоли визуализировали с настройками T\*2. Эффективность НЧ на МРТ диагностике

162

оценивали по проценту опухолей с повышенным контрастом (Таблица 23) и типу передачи сигналов (фокальное или диффузное контрастирование). Ранее было показано, что одни наночастицы (наносферы и нанодиски) доставлялись к границе опухоли, тогда как другие (наностержни и нанокластеры) демонстрировали равномерное накопление по всей опухоли [303]. Локальное и диффузное MP-контрастирование можно объяснить различиями в распределении в опухолях.

В соответствии с данными о биораспределении лучший контраст, усиливающий опухоль, был выявлен в модели В16. НЧ были обнаружены в 88% опухолей, в первую очередь по диффузному снижению сигнала в опухолевых тканях (Таблица 23 и Рисунок 77).

Таблица 23 – Процент опухолей с эффективным МРТ контрастированием после введения НЧ Результаты представлены, как среднее значение ± ошибка среднего. \* p=0,02; \*\*p=0,003; #p=0,037 (критерий χ-квадрат)

	<b>4</b> T1	B16	<b>CT26</b>	Все опухоли
НЧкуб	100%	57±20%	70±15%	73±10% *
НЧст	60±16%	100%	30±15%	63±9% #
НЧкл	100%	100%	90±10%	96±4% * #
Все НЧ	82±8%	88±7% **	63±9% **	78±5%



Рисунок 77 – Динамика накопления МНЧ в опухолях В16. Репрезентативные Т2\*-взвешенные МРТ-изображения опухолей В16, полученные до и в течение 24 ч после внутривенного введения НЧ (5 мг/кг). Очаги усиленного контрастирования опухоли показаны стрелками

Визуализация опухолей 4T1 с усиленным контрастированием НЧ также была эффективна (82% для трех типов НЧ), в то время как контрастирование (преимущественно фокальное) опухоли СТ26 было обнаружено с помощью МРТ только в 63% опухолей (Таблица 23, Рисунок 78 и Рисунок 79) [304].



Рисунок 78 – Динамика накопления МНЧ в опухолях 4Т1. Репрезентативные T2\*-взвешенные МРТ-изображения опухолей 4Т1, полученные до и в течение 24 ч после внутривенного введения НЧ (5 мг/кг). Очаги усиленного контрастирования опухоли показаны стрелками



Рисунок 79 – Динамика накопления МНЧ в опухолях СТ26. Репрезентативные Т2\*-взвешенные МРТ-изображения опухолей СТ26, полученные до и в течение 24 ч после внутривенного введения НЧ (5 мг/кг). Очаги усиленного контрастирования опухоли показаны стрелками

Среди исследованных НЧкл продемонстрировали наилучшие МРТконтрастные свойства (Таблица 23). Диффузное контрастирование было обнаружено в 96% опухолей после введения НЧкл. НЧкуб и НЧст обеспечивали обнаруживаемую передачу сигналов опухоли в 73% и 63% опухолей соответственно. Интересно, что НЧкуб обеспечивали лучшее контрастирование для опухолей 4T1, но не были эффективны при контрастировании опухоли B16 (100% и 57% опухолей соответственно), тогда как для НЧст наблюдалась обратная тенденция, позволяющая усиливать контрастирование для 60% 4T1 и 100% опухолей B16. В целом наиболее эффективное контрастирование опухоли соответствовало 6-24 ч после введения НЧкуб и НЧкл, тогда как накопление НЧст в новообразованиях достигало максимума в первые 30 мин при в/в введении [304]. Среди моделей опухолей максимальное поглощение СТ26 для НЧкуб и НЧст было примерно через 6 часов после лечения, но опухоли 4Т1 и В16 продолжали накапливать НЧ до 24 часов после инъекции.

#### 3 Обсуждение результатов

Анализ современного состояния области синтеза магнитных наночастиц показал, что среди большого разнообразия методов синтеза наиболее распространены метод соосаждения солей железа в водных растворах и метод термического разложения металлорганических прекурсоров в высококипящих растворителях. К преимуществам первого метода можно отнести простоту органических реализации, отсутствие необходимости использования растворителей, более доступные реагенты, тогда как к преимуществам второго метода относятся возможность получения монодисперсных суспензий наночастиц, меньшее количество дефектов кристаллической структуры, а получения наночастиц с формой также возможность отличной OT сферической. Таким образом, в данном исследовании, посвященном влиянию морфологии наночастиц на их свойства, был выбран метод термического разложения, как единственный, позволяющий получать монодисперсные магнитные наночастицы с заданными размерами и формой. Тем не менее для ряда наночастиц, в частности феррита кобальта, были использованы и методы соосаждения из водных растворов для получения образцов сравнения.

#### 3.1 Влияние ПАВ на форму НЧ

Применение НЧ в качестве терапевтических и диагностических средств требований свойствам наночастиц, предъявляет ряд К таких как гидрофильность и агрегативная устойчивость в водно-солевых буферах. Таким образом, перед использованием НЧ в биомедицинских применениях требуется введение дополнительной стадии функционализации поверхности гидрофильности для придания увеличения стерического И И электростатического отталкивания, увеличивающих агрегативную устойчивость. В ходе литературного обзора, было выявлено, что метод разложения металлорганических прекурсоров позволяет термического получать НЧ с хорошо контролируемыми параметрами и высокими выходами.

168

Необходимыми компонентами реакционной смеси являются различные гидрофобные ПАВ, например, на основе жирных кислот или их производных. Кроме того, для реакций термического разложения известны примеры, где сам растворитель выступает также в роли ПАВ, однако выбор такого растворителя условий. В частности, ограничен рядом температуры разложения используемых металлсодержащих прекурсоров, такие как ацетилацетонаты и олеаты, находятся в диапазоне 150-200 °C, что накладывает требования к температуре кипения выше 200 °С на используемый растворитель. Кроме того, он не должен вступать в химические реакции с прекурсором и растущими кристаллами НЧ, и должен обеспечивать их растворимость. Среди всех растворителей такими свойствами обладает небольшой ряд веществ, а в частности: дифениловый эфир, дибензиловый эфир, октадецен-1, бензиловый спирт.

Кроме того, все больший интерес вызывает исследование влияния не только размера, но и формы и состава НЧ на их функциональные характеристики. Для получения НЧ с формой, отличной от сферической, также требуется введение в реакционную среду молекул ПАВ, способных избирательно сорбироваться на определенных гранях растущих зародышей НЧ, приводя к предотвращению роста НЧ в определенных кристаллографических направлениях и появлению анизотропии формы.

Таким образом, метод термического разложения был выбран в качестве основного метода, а его модификация проводилась в двух направлениях: 1) поиск растворителя для получения НЧ с гидрофильной поверхностью за счет отсутствия ПАВ; 2) исследование влияния ПАВ на морфологию НЧ.

## Исследование влияния реакционных параметров на размер НЧсф

В качестве метода синтеза НЧ оксида железа сферической формы был выбран метод термического разложения металлорганических соединений в высококипящих органических растворителях. Данный метод характеризуется рядом преимуществ, таких как: 1) возможность получения монодисперсных НЧ; 2) возможность получения НЧ с высокой упорядоченностью кристаллической решетки [305]. Для синтеза НЧ использовали разложение ацетилацетоната железа (III) в бензиловом спирте.

Основным преимуществом данного метода является отсутствие гидрофобных молекул ПАВ, таких как олеиновая кислота, олеиламин и другие. Отсутствие гидрофобных молекул, сорбированных на поверхности НЧ, существенно облегчает дальнейший перевод НЧ в водную среду.

Процесс получения НЧ можно разбить на два основных этапа: 1) нуклеация НЧ, происходящая при нагревании реакционной смеси от 150 до 175 °C ;2) рост сформированных на первом этапе зародышей при кипячении реакционной смеси в течение 40 часов.

Нуклеация НЧ происходит при разложении ацетилацетоната железа (III) при нагревании. Процесс разложения ацетилацетоната в бензиловом спирте при нагревании был исследован в диапазоне температур 115- 175°С. В ходе работы впервые было исследовано влияние температуры реакционной среды и времени реакции на размер НЧ. Было показано, что при температуре 115°C на оптическом спектре присутствует интенсивный пик поглощения при длине 450 нм, соответствующий поглощению чистого ацетилацетоната, при температуре 150°C интенсивность немного снижается, тогда как при температуре 175°С пик полностью исчезает. При этом из литературных данных известно, что температура разложения ацетилацетоната железа (III) составляет 184°С, однако эти данные были получены при разложении ацетилацетоната в невосстанавливающем растворителе (дибензиловом эфире), тогда как в нашем случае был использован бензиловый спирт, обладающий восстановительными свойствами. Было установлено, что выдержка реакционной смеси при Т<sub>кип.</sub> бензилового спирта в течении 40 часов приводит к увеличению размера НЧ с 6 нм до 10 нм.

#### Исследование влияния реакционных параметров на размер НЧкуб

При синтезе наночастиц в растворах процесс формирования НЧ начинается с образования небольших кластеров, содержащих несколько десятков атомов, которые выступают в качестве зародышей дальнейшего роста кристаллов. Так, методами рентгеноструктурного анализа было показано, что в процессе синтеза наночастиц магнетита путем соосаждения солей железа первоначально образуются кластеры железа, содержащие 13 атомов железа, также известные как кластеры Кеггина [306]. Дальнейший рост происходит благодаря диффузии молекул прекурсора к поверхности растущей наночастицы и осаждению атомов железа и кислорода на поверхность растущей наночастицы. При этом скорость роста кристалла может быть неодинакова в различных направлениях, так как различные грани обладают различной термодинамической стабильностью и скоростью роста. При этом размер наиболее быстро растущей грани в процессе синтеза будет увеличиваться по сравнению с гранями, растущими медленнее. К сожалению для большинства магнитных материалов и оксидов железа, в частности, их кристаллическая структура практически изотропна, и такие материалы как правило не проявляют тенденции к формированию анизотропных кристаллов.

В основе метода получения магнитных наночастиц с анизотропной формой лежит процесс избирательной сорбции молекул ПАВ на поверхность растущих наночастиц оксида железа. Сорбция молекул ПАВ неоднородна по отношению к различным граням, что позволяет влиять на скорость роста кристалла в определенном направлении. Среди таких лигандов можно отметить олеиламин, додецилдиметиламмония бромид, цетилтриметиламмония бромид, октадециламин.

Синтез кубических НЧ (НЧкуб) проводили термическим разложением олеата (Fe(OL)<sub>3</sub>) или ацетилацетоната (Fe(acac)<sub>3</sub>) железа (III) в высококипящих растворителях, таких как 1-октадецен (T<sub>кип</sub> = 314°C) или дибензиловый эфир

(T<sub>кип</sub> = 296°С), соответственно, с добавлением поверхностно-активных веществ – олеиновой кислоты (ОК) и ее производных.

Для получения НЧкуб было решено варьировать соотношение прекурсора (Fe(OL)<sub>3</sub>) и олеиновой кислоты, используемой в качестве ПАВ. Для этого необходимо было получить сам олеатный комплекс железа из олеата натрия и хлорида железа. Интересно отметить, что очистка Fe(OL)<sub>3</sub> от продуктов реакции является довольно важным этапом, так как избыток хлорид ионов, входящих в состав NaCl, образующегося в ходе реакции, сам по себе оказывает влияние на форму НЧ. В случае наличия избытков Cl<sup>-</sup> ионов были получены не кубические и вогнутые наночастицы. Ранее было показано, что хлорид ионы обладают высоким сродством к граням (311), что приводит к структур с вогнутыми гранями [307]. Интересно, получению что использование фторид или бромид ионов в аналогичном синтезе не приводит к образованию вогнутых граней, что косвенно подтверждает роль именно хлорид ионов в образовании подобных структур. Для получения кубических Fe  $(OL)_3$ наночастиц было решено добавить отмывки стадию деионизированной водой, чтобы избавиться от избытков NaCl.

Ранее в литературе был описан подход к получению кубических наночастиц различного размера, однако в данном методе варьирование размеров достигалось за счет изменения температуры реакционной смеси. Данный подход хорошо воспроизводим в условиях небольших объемов реакционной смеси, однако масштабирование на большие объемы может быть затруднительным ввиду сложности поддержания гомогенности температуры и нагрева. Для решения данной проблемы нами было впервые предложено использовать более удобный подход, заключающийся в варьировании соотношения прекурсор/ПАВ.

Как видно из микрофотографий, при использовании соотношений Fe(OL)<sub>3</sub>/OK = 9, 3, 1 происходит образование НЧкуб с размерами 10, 15 и 20 нм. Полученные наночастицы характеризуются кубической морфологией и узким распределением по размерам. К сожалению, получение НЧ с большим

размером при использовании Fe(OL)<sub>3</sub> в качестве прекурсора не представляется возможным. Скорее всего, это связано с избытком олеиновой кислоты в реакционной смеси, адсорбция которой на поверхности растущих НЧ полностью блокирует их рост, особенно в условиях низкой концентрации железосодержащего прекурсора. Для получения НЧкуб размером 30 нм было решено использовать Fe(acac)<sub>3</sub>, который способен реагировать с ОК с образованием Fe(OL)<sub>3</sub>, но при этом не увеличивается количество ОК, вносимое с прекурсором дополнительно к свободным молекулам ОК.

### Получение НЧкл

Образование кластерных НЧ, состоящих из отдельных НЧ, может приводить к появлению необычных магнитных свойств, к увеличению значений T2 релаксивности за счет диполь-дипольных взаимодействий между отдельными магнитными кристаллами, формирующими кластер, а также за счет увеличенной площади поверхности по сравнению С цельно кристаллическими НЧ. Каждый отдельный кластер НЧ может быть рассмотрен с одной стороны, как ансамбль индивидуальных НЧ, входящих в его состав, а с другой стороны, как целая индивидуальная частица. Цель данного исследования было сравнить свойства индивидуальных наночастиц с кластерами схожего размера. Среди таких свойств наибольший интерес представляют физико-химические свойства, такие как Т2 релаксивность, намагниченность насыщения и коэрцитивная сила, а также биологические свойства, такие как механизмы интернализации в клетках и распределение в организме после внутривенного введения. В отличие от сфер и кубов метод получения кластеров на момент начала работ не был описан. Одним из немногих подходов к получению НЧкл является использование в реакционной смеси ПАВ с объемными группами, таких как 1-адамантанкарбоновая кислота [83]. Однако на данный момент до конца нет достаточной информации о роли заместителя и механизме формирования НЧкл.

С целью решения данного вопроса был использован ряд органических кислот с различными по размерам заместителями: циклопропанкарбоновую, циклобутанкарбоновую, циклопентанкарбоновую, циклогексанкарбоновую, бензойную, бифенил-4-карбоновую и 1-инданкарбоновую, как в чистом виде, так и в смеси с ОК (Таблица 24).

Образцы Кислоты	К 1	К 2	К 3	К 4	К 5	К 6	К 7	К 8	К 9	К 1 0	К 1 1	К 1 2	К 1 3	К 1 4
Олеиновая														
Циклопропанкарбоновая														
Циклобутанкарбоновая														
Циклопентанкарбоновая														
Циклогексанкарбоновая														
Бензойная														
Бифенил-4-карбоновая														
1-Инданкарбоновая														

Таблица 24 – Органические кислоты, использованные для синтеза Н	y	Ð	k	J	]
---	---	---	---	---	---

Образцы К1, К3, К5, К7, К9, К11 и К13 были получены с использованием смеси олеиновой кислоты (6 ммоль) и другой органической кислоты (6 ммоль) (мольное соотношение = 1: 1) [293]. Получение НЧкл может быть рассмотрен как одно- или двух-стадийный процесс, а именно: 1) одностадийный синтез, когда самосборка в кластеры происходит параллельно с их образованием; 2) двухстадийный синтез, включающий получение отдельных НЧ и их дальнейшую контролируемую агрегацию. В случае одностадийного синтеза основным условием образования кластерных наночастиц является процесс сорбции-десорбции органических лигандов с поверхности НЧ [293]. В случае лигандов с относительно объёмным, но коротким заместителем становится возможным стерическое сближение и агрегация НЧ с образованием кластеров. Используемые нами в качестве лигандов органические кислоты сорбируются на поверхности НЧ за счет взаимодействия карбоксильной группы с атомами железа, при этом углеводородный радикал оказывается экспонирован в органическую фазу. Поскольку все используемые кислоты содержат одну карбоксильную группу, можно принять, что энергия их взаимодействия с

поверхностью НЧ примерно одинакова, и в этом случае основным фактором, определяющим какая часть лиганда будет сорбирована на поверхности НЧ, а какая в растворе зависит от сродства лиганда к растворителю, в нашем случае в качестве которого был использован дибензиловый эфир (logP = 3,95). Среди всех использованных циклокарбоновых кислот циклопропанкарбоновая кислота имеет самое низкое сродство к дибензиловому эфиру и является наименее гидрофобной (Таблица 25).

Таблица 25 – Основные физические характеристики кислот, использованных в синтезе НЧкл

Кислоты	logP	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

При получении НЧ она прочно сорбируется на поверхность и обеспечивает формирование кластерных HY. При увеличении углеводородного фрагмента повышается гидрофобность кислот, что смещает равновесие в сторону перехода в раствор, при этом для наиболее гидрофобной циклогексанкарбоновой кислоты уже не наблюдается формирование кластерных НЧ [293]. Аналогичная тенденция наблюдается в случае кислот, когда использование наиболее ароматических гидрофильной бензойной кислоты приводит к образованию кластеров, тогда как добавка наиболее гидрофобной кислоты не приводит к образованию кластеров. С целью доказать данную гипотезу нами было решено повторить синтезы с добавлением ОК. При добавлении ОК она может замещать другие органические кислоты с поверхности НЧ, что будет приводить к изменению формы получаемых НЧ. Действительно в случае всех кислот кроме циклопропанкарбоновой в синтезах с добавлением ОК нами были получены наночастицы сферической морфологии. Для ароматических кислот подобная картина наблюдалась только для наиболее гидрофобной бифенил-4карбоновой кислоты.

На основании полученных данных нами был предложен механизм формирования НЧкл в указанных условиях, который представляет собой двухстадийный процесс: 1) первоначальное формирование небольших НЧ; 2) агрегация НЧ с образованием НЧкл. При этом ключевым фактором является использование лигандов с относительно небольшими заместителями, таких как циклопропанкарбновая кислота, которые создают меньший по размеру диффузный слой по сравнению с ОК, что позволяет НЧ сблизиться на расстояние достаточное для их агрегации с образование НЧкл.

#### Исследование влияния реакционных параметров на синтез НЧст

Анизотропия формы является важным параметром, влияющим на магнитные свойства наночастиц. Изменение размера и аспектного соотношения, позволяет получать недостижимые для изотропных НЧ значения коэрцитивной силы  $H_c$ , скорости r2-релаксации, SAR и т.д, при этом эти свойства можно контролировать, изменяя форму НЧ, что вызывает большой интерес с точки зрения их применения в качестве контрастных средств и препаратов для магнитной гипертермии. Среди всех исследованных нами НЧ наиболее выраженной анизотропией формы обладают наночастиц стрежневидной морфологии.

Синтез НЧ<sub>ст</sub>, которые затем могут быть получены в виде стабильной водной суспензии, представляет собой еще более сложную задачу, так как НЧ<sub>ст</sub> как правильно имеют выраженные ферромагнитные свойства и склонны к агрегации. В качестве метода синтеза нами было решено использовать двухстадийный подход, в котором на первой стадии при высокотемпературном гидролизе FeCl<sub>3</sub> в присутствии ПАВ (дофамина или разветвленного высокомолекулярного ПЭИ (М<sub>w</sub> ~ 25кДа)) образуются немагнитные стержневидные НЧ акагенита (β-FeOOH), которые затем используются в качестве прекурсора. Выбранные в качестве ПАВ вещества обладают первичной аминогруппой и способны к специфической адсорбции на гранях растущего кристалла и обеспечивают образование НЧст. Интересно отметить, что ПЭИ обеспечивал формирование более удлиненных НЧст с l = 21 нм, и d = 4 нм (аспектное соотношение 5,3:1), тогда как использование дофамина вызывало образование более крупных НЧ с меньшим аспектным соотношением (l=40 нм, d=10 нм, аспектное соотношение 4:1) (Рисунок 38) [308]. Скорее всего это связано с более разветвлённой структурой ПЭИ и, следовательно, более затрудненной диффузией мономера к поверхности растущего кристалла. В пользу этого свидетельствует тот факт, что снижение концентрации ПЭИ приводит к снижению размера и аспектного соотношения [309]. Полученные на первом этапе НЧст состоят из немагнитного акагенита и ИХ дальнейшее применение не представляется возможным, поэтому необходимо восстановить полученные НЧ до магнетита и при этом избежать потери стержневидной формы. Подобную реакцию удалось осуществить в условиях микроволнового синтеза с использованием гидразин гидрата (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) в качестве восстановителя. Облучение проводили в герметичной ампуле, а в качестве основных варьируемых параметров были выбраны количество концентрация восстановителя. Для циклов И полного восстановления акагенита до магнетита необходимо было провести не менее трёх циклов обработки микроволновым излучением. При использовании одного цикла наблюдалось образование немагнитных НЧ, а два цикла позволили добиться частичного восстановления, но рентенофазовый анализ показал наличие немагнитных примесей гетита (α-FeOOH) и акагенита. Три цикла оказалось достаточно для полного восстановления прекурсора без потери его формы. Решающее влияние на форму получаемых НЧ оказала концентрация восстановителя. При концентрации гидразин гидрата 0,052 М и трёх циклах были получены НЧст состоящие из магнетита. Дальнейшее увеличение концентрации до 0,103 М приводит к появлению полиморфных НЧ наряду с НЧст, а при концентрации 0,503 М полученные НЧ имеют крайне широкое разнообразие форм и размеров, а стержневидных наночастиц практически не наблюдается. Подобное влияние концентрации гидразин гидрата наблюдается как для частиц акагенита, покрытых дофамином, так и полиэтиленимином (Рисунок 39).

## Исследование влияния реакционных параметров на синтез НЧ феррита кобальта

Кроме анизотропии формы, чьё влияние наиболее ярко выражено для стержневидных наночастиц, не менее важным параметром, влияющим на свойства наночастиц, является магнитокристаллическая анизотропия, наиболее ярко выраженная для ферритов двухвалентных металлов, например феррита кобальта.

Схематичное изображение реакции получения ФК можно представить следующим образом (Рисунок 80):



Рисунок 80 – Схема реакции синтеза НЧ СоFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

На первом этапе реакции происходит образование промежуточных комплексов – олеата железа (III) и олеата кобальта (II), которые затем

разлагаются с образованием конечного продукта – НЧ СоFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [310]. ОК и ОА являются одними из наиболее часто используемых ПАВ в процессе синтеза НЧ различного фазового состава морфологии И [311–314]. Длинные алифатические группы (~1,5 нм) обусловливают высокую агрегативную стабильность получаемых коллоидных растворов НЧ в неполярных органических растворителях [315]. Также ранее было показано, что дибензиловый эфир является наиболее предпочтительным растворителем при проведении реакций по синтезу НЧ методом термического разложения металлосодержащих прекурсоров [316]. В отличие, например, от октилового эфира и 1-октадецена, дибензиловый эфир приводит к резкому улучшению кристалличности НЧ благодаря его способности, наряду с олеиновой кислотой и олеиламином, принимать участие в окислительно-восстановительных процессах. Контроль за размером получаемых НЧ осуществляли путем прекурсоров, подбора концентрации а варьирования общей также продолжительности реакции (Таблица 26). Так, для получения небольших по размеру НЧ СоFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (10 – 30 нм) были использованы наибольшие концентрации ОК и ОА. На сегодняшний день, эффект влияния концентрации ПАВ на форму и размер получаемых НЧ изучен достаточно широко и отражен в различных научных работах, посвященных химическому синтезу НЧ [293,317–320].

	Количе-	Количе-	Коли-	Количе	Продолжи-	Размер НЧ
050000	ство	ство	чество	ство	тельность	по ПЭМ
Образец	Fe(acac) <sub>3</sub> ,	$Co(acac)_2$ ,	ΟК,	OA,	реакции,	(диагональ
	ММОЛЬ	ММОЛЬ	ММОЛЬ	ММОЛЬ	час	), нм
ФК-1	1	0,5	12	2	2	14
ФК-2	2	1	12	2	2	27
ФК-3	4	2	8	2	4	99
ФК-4	4	2	8	2	8	150

	<b>\</b>	$\sim$				U U
	16 1	IOHODIH IA	TT 01	301 <i>1</i> 0T1	NTT '	nootetttttt
гаолина	20 - 0	ЛСНОВНЫС	IIAI	JANCI	ОЫ	осакний
1		••••••			~ ~ ~	p • • • • • • • • • • • • • • • • • • •

Как правило, повышение общей концентрации ПАВ в реакционной смеси влечет за собой уменьшение среднего размера магнитного ядра НЧ [321]. Адсорбируясь на различных гранях зародышей НЧ, формирующихся в процессе разложения металлосодержащих прекурсоров, молекулы ПАВ минимизируют свободную поверхностную энергию кристалла, препятствуют диффузии ионов металла к поверхности растущих НЧ, а также не позволяют отдельным упорядочиваться агрегировать ΗЧ И друг с другом контролируемым образом (эффект кластеризации). Например, чем выше концентрация олеиновой кислоты в реакционном растворе, содержащем  $Fe(acac)_3$ дибензиловый эфир, выше И тем температура процесса зародышеобразования и тем меньше, в итоге, размер ядра получаемых НЧ [321].

# 3.2 Исследование стабилизации НЧ биосовместимыми низко- и высокомолекулярными соединениями

Для использования НЧ в биомедицине необходимым условием является получение стабильной коллоидной суспензии НЧ в водных растворах с физиологическими значениями ионной силы. Основным подходом В стабилизации НЧ является создание поверхностного слоя, обеспечивающего стерическое или электростатическое отталкивание наночастиц друг от друга, препятствующего их агрегации и выпадению в осадок. В качестве материалов подобных покрытий могут быть использованы низкомолекулярные вещества, такие как цитрат- или фосфат- ионы, дофамин и его аналоги, органические такие как поликатионы, полианионы, полимеры, полиэтиленгликоль, неорганические вещества, такие как оксид кремния или золото. Для наиболее успешного применения к материалу покрытия предъявляется ряд требований: 1) материал должен обладать низкой токсичностью 2) он должен быть биоразлагаем 3) должны существовать пути его выведения 4) он должен обеспечивать защиту от неспецифического захвата НЧ клетками иммунной
системы или РЭС. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что наиболее подходящими материалами являются низкомолекулярные вещества, встречающиеся В организме, например катехоламины, углеводы, аминокислоты, либо же биополимеры на их основе, такие как декстран, нуклеиновые кислоты, хитозан или белки. Наиболее интересны с этой точки зрения именно белковые молекулы, так как, кроме обеспечения коллоидной стабильности за счет адсорбции на поверхность они могут обеспечивать ряд других функций, а в частности обладать ферментативной активностью, служить переносчиком лекарственных веществ или адресным лигандом для доставки, что открывает перспективы использования НЧ, покрытых белками для применения в тераностике. В настоящей работе в качестве молекулстабилизаторов, обеспечивающих все необходимые свойства, были выбраны: цитрат-ион, дофамин, нитродофамин, ПЭГ, плюроник и сывороточный альбумин.

#### Стабилизация НЧсф с помощью сывороточного альбумина

Ранее нами было показано, что полиэлектролиты, такие как полиакриловая кислота, полиглутаминовая кислота и полилизин способны сорбироваться на поверхность НЧсф, возможно, за счет адсорбции и электростатических взаимодействий. В связи с этим было решено проверить возможность использования белкового покрытия из сывороточного альбумина для стабилизации НЧ. Сывороточный альбумин имеет ряд преимуществ, которые делают его перспективным при использовании в качестве покрытия для НЧ. Известно, что сывороточный альбумин проявляет низкую токсичность и иммуногенность, является биоразлагаемым полимером и выполняет функцию переноса ксенобиотиков, а значит, покрытие на его основе может быть использовано не только для стабилизации коллоидных растворов наночастиц, но и для связывания лекарств на поверхности наночастиц.

Основным отличием НЧсф, получаемых разложением ацетилацетоната в бензиловом спирте, от подавляющего большинства НЧ, получаемых путем металлорганических соединений разложения В высококипящих растворителях, является их способность образовывать стабильные водные коллоидные растворы при рН 10-11 в отсутствии каких либо ПАВ. При добавлении к водным растворам НЧ раствора сывороточного альбумина происходит сорбция молекул ЧСА на поверхность. При этом процесс сорбции является обратимым, а связь ЧСА с поверхностью НЧ недостаточно прочная, чтобы стабилизировать НЧ при физиологических значениях рН или ионной силы. Чтобы обеспечить формирование стабильного покрытия, нами было решено зафиксировать адсорбированные на поверхности НЧ молекулы ЧСА за счет межмолекулярных сшивок путем добавления глутарового альдегида. Стабилизированные таким образом НЧсф представляют собой конгломераты нескольких частиц, заключенные в общую оболочку из сшитых молекул ЧСА. Наличие межмолекулярных сшивок не дает возможности НЧ выйти из оболочки, сформированной молекулами белка, которая, в свою очередь, за счет поверхностного заряда и стерического отталкивания препятствует агрегации НЧ. Важно отметить, что получение стабильного водного коллоидного раствора было возможно только в случае применения НЧсф с размером кристаллического ядра 4-6 нм, тогда как использование НЧ с большим размером приводит к неполному растворению НЧ в воде при щелочных значениях рН, увеличению размеров НЧ при сорбции ЧСА и выпадению осадка при попытке стабилизировать полученные структуры путем межмолекулярной сшивки глутаровым альдегидом. Однако оказалось возможным получение НЧ-СА двух разных размеров путем разделения исходной реакционной смеси с помощью гель - проникающей хроматографии. При этом становится возможным получить две фракции НЧ-СА, имеющие разный гидродинамический размер, но состоящие из одинаковых ядер. При этом НЧ-СА размером 40 нм содержат всего несколько кристаллических ядер, тогда как НЧ-СА размером 80 нм содержат 5 и более ядер в составе одной

наночастицы. Отдельно стоит отметить, что оба типа НЧ-СА сохраняют свою стабильность долгое время (вплоть до года) при сохранении температурного режима от +4 до +8 °C и в асептических условиях. Безусловно, использование в качестве покрытия ЧСА имеет ряд серьёзных преимуществ, однако разработанный подход требует либо использования НЧ, растворимых в воде, либо растворения молекул покрытия в органических растворителях. В случае с ЧСА нам не удалось получить его растворы ни в одном из растворителей, используемых для получения НЧ. Кроме того, даже для НЧ, синтезируемых в водных растворах, не получается добиться начальной сорбции молекул ЧСА на их поверхности. Поэтому для получения водных растворов остальных типов НЧ были разработаны другие подходы.

Таким образом, с использованием нового подхода, были получены стабильные, водорастворимые образцы: НЧ-СА-40 и НЧ-СА. Данный подход позволяет получать различные по гидродинамическому размеру конгломераты, содержащие НЧ оксида железа одного размера.

## Стабилизация НЧкуб, НЧкл и НЧст

Как было сказано ранее НЧкуб и НЧкл могут быть получены только путем термического разложения металлорганических прекурсоров В высококипящих органических растворителях в присутствии ПАВ, что делает невозможным их перенос в водную среду без стадии дополнительной модификации поверхности. Модификация поверхности амфифильными полимерами является популярным подходом, а спектр таких полимеров довольно широк. Среди преимуществ данного метода можно отметить высокую стабильность получаемых НЧ и большую вариабельность в подборе Необходимым требованием полимера. к полимерам является ИХ стабильность амфифильность И при контакте органическими С растворителями. В качестве таких полимеров нами было решено выбрать плюроники, среди которых плюроник F127 позволил получить наиболее

стабильную и не обладающую токсичностью водную коллоидную суспензию магнитных НЧ.

#### 3.3 Влияние размера и покрытия на токсичность НЧ

В ходе проведенных экспериментов по клеточной пролиферации было обнаружено, что НЧ-СА-ПЭГ оказались наименее токсичными для клеточной линии фибробластов человека. Этот факт можно объяснить защитным действием ПЭГ-покрытия, которое предотвращает активное поглощение НЧ клетками и задерживает их деградацию с высвобождением ионов Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>. В то же время жизнеспособность клеток U251 не изменялась при воздействии ни одного из типов протестированных НЧ. Известно, что клетки глиобластомы характеризуются мутациями в ряде генов, которые влияют на их высокую скорость пролиферации, высокую инвазивность и резистентность к химио- и лучевой терапии [322]. Например, индукция экспрессии варианта рецептора эпидермального фактора роста класса III (EGFRvIII; нормальная онкогенная форма увеличивала пролиферации EGFR) скорость астроцитов И резистентность к лучевой терапии [323]. Другим белком, на функции которого часто влияют мутации, является p53, который контролирует клеточный цикл, репарацию ДНК, апоптоз и многие другие процессы [322]. Мутации в EGFR, р53 и некоторых других белках приводят к повышению жизнеспособности опухолевых клеток, особенно при воздействии ионов железа. Подсчет площади слияния является прямым методом измерения цитотоксичности материалов, но не позволяет выявить механизм токсического действия. Затем для более детального исследования были выбраны анализы методом ЛДГ и МТТ тестов. В их основе лежат ферментативные НАДН/НАД+-зависимые реакции, протекающие в разных компартментах клетки: фермент ЛДГ локализован в цитоплазме, тогда как ферменты, обеспечивающие окисление (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-MTT тетразолия бромид) и его производных, локализованы в митохондриях. Тем не менее, эти методы не могут точно измерить количество свободных радикалов, таких как супероксидные или пероксидные радикалы в клетках, которые, как предполагается, являются основной причиной токсичности ионов Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>; поэтому мы провели оценку уровня АФК с помощью анализа DCFDA. Сравнение различных анализов показывает корреляцию между внутриклеточным уровнем АФК и токсическим действием на клетки. Кроме того, было также продемонстрировано, что наночастицы Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> вызывают окислительный стресс с последующими значительными модификациями экспрессии различных белков, что приводит к апоптозу клеток Нер G2 в зависимости от времени [324]. Эти факты подтверждают, что индуцированное НЧ образование АФК служит одной из основных причин цитотоксичности НЧ Более таких материалов. низкая **ШИТОТОКСИЧНОСТЬ** ЛЛЯ высокозлокачественных клеток U251 может быть объяснена сверхэкспрессией антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза [325][326]. Эти ферменты участвуют в нейтрализации АФК, тем самым уменьшая общее негативное влияние на клетку. При более длительном воздействии может быть обнаружена цитотоксичность НЧ из-за повреждения ДНК. В присутствии ионов железа в клетке может происходить перепроизводство свободных радикалов по реакции Фентона [327]. Эти АФК могут диффундировать в ядро и напрямую повреждать ДНК с образованием разрыва двойной цепи [328]. Как оказалось, существует корреляция между Комета тестом и DCFDA тестом. НЧ-СА-40 вызывали сильную фрагментацию ДНК в клетках фибробластов человека через 48 часов дозозависимым образом. Мы полагаем, что повреждение ДНК происходит за счет образования АФК, что подтверждается анализом DCFDA. Напротив, НЧ-СА-ПЭГ не продемонстрировал таких эффектов. Подобное свойство ПЭГ-покрытия токсических было подтверждено многочисленными исследованиями [329,330]. В совокупности наши данные показывают, что покрытие наночастиц альбумина обеспечивает стабильную и биосовместимую оболочку и предотвращает цитотоксичность

магнетитового ядра. Для клеток HF и U251 наиболее токсические эффекты наблюдаются через 48 часов после воздействия HЧ, когда начинается разложение железного ядра. Значительное увеличение внутриклеточных АФК через 48 часов после инкубации позволяет предположить, что продукция АФК является основной причиной токсичности ИОНП. Однако стабилизация HЧ молекулами ПЭГ может быть мощным инструментом для уменьшения этих токсических эффектов.

# 3.4 Влияние свойств НЧ на применение в качестве МРТ контрастных агентов

Эффективность НЧ в качестве контрастных агентов наиболее целесообразно оценивать с точки зрения их способности контрастировать опухолевые ткани при проведении МРТ исследования. При этом факторы, влияющие на эту способность, можно отнести к двум категориям: 1) Т2 релаксивность НЧ; 2) фармакокинетические параметры НЧ. В свою очередь, Т2 релаксивность НЧ наиболее сильно зависит от состава, размера и формы магнитного ядра НЧ, тогда как фармакокинетические параметры зависят в большей степени от гидродинамического размера НЧ в водном растворе и структуры поверхности.

Хотя обширный спектр работ дал много ценных сведений о вкладе размера частиц и химического состава поверхности в визуализацию опухолей in vivo, информации о биологическом влиянии, оказываемом формой частиц, относительно мало [331]. Эффективность визуализации зависит как от эффективности доставки НЧ к целевым тканям, так и от магнитных характеристик. Нанокубы (наряду с наносферами) в настоящее время являются наиболее часто используемыми контрастными агентами, демонстрирующими существенное усиление контраста. Однако появляется все больше доказательств того, что эти наноструктуры менее эффективны при доставке в злокачественные ткани, чем наностержни [332–334]. Кроме того, в то время как наносферы и нанодиски были обнаружены только на краях опухоли, наностержни были перераспределены по всей опухоли [303]. В силу своей двойственной природы нанокластеры представляют особый интерес для MPT-диагностики. Кластер можно рассматривать как отдельный нанообъект, но его магнитные характеристики определяются вкладом каждой наночастицы. В результате НЧкл может проявлять повышенные значения намагниченности насыщения и релаксации по сравнению с отдельными наночастицами [335–337].

Несмотря на многочисленные исследования НЧ in vivo, лишь в немногих из них проводят сравнения частиц в одинаковых условиях [332,333]. Большинство данных о влиянии размера или формы на биологическую эффективность поступает из исследований на разных моделях опухолей, с разными схемами лечения и различными параметрами НЧ. Чтобы проверить, определяют ли форма и структура контрастность МРТ, мы стремились сохранить постоянство физико-химических свойств НЧ В наших иследованиях. Таким образом, все НЧ были покрыты плюроником-127 и имели близкие значения поверхностного заряда. Плюроники состоят из поли(этиленоксида)-поли(пропиленоксида)-поли(этиленоксида) (ПЭО-ППО-ПЭО), в котором ППО является гидрофобным сегментом и составляет 30% блок-сополимера, тогда как ПЭО является гидрофильным сегментом и его доля составляет 70% блока-сополимера [338]. Предыдущие исследования показали, что плюроник F127 имеет преимущество перед другими плюрониками в способности доставлять НЧ в опухолевые ткани [339]. Все исследованные НЧ имели одинаковый размер кристаллитов 10-20 нм, однако гидродинамический размер колебался от 65 нм для НЧкуб до 120 нм для НЧст. Следует отметить, что всех остальных параметров сохраненялись фактически морфологии только ядра практически одинаковыми, a изменение нереализуемо для таких разных форм, как нанокуб и наностержень [11]. Тем не менее, все исследованные НЧ имели гидродинамический размер, предпочтительный для уклонения от захвата макрофагами и почечной

элиминации и проникновения в опухоли путем эффекта повышенного захвата и удержания [340–342].

Среди трех НЧкуб продемонстрировали самые высокие показатели релаксивности in vitro и лучшую эффективность доставки к месту опухоли. Однако НЧкл превосходили НЧкуб в контрастировании злокачественных тканей. Несоответствие между оценкой Т2-релаксации in vitro и in vivo, вероятно, связано с разной степенью влияния ткани на сигнал МРТ. Например, профили распределения в тканях (глубокое проникновение или поверхностное накопление) могут влиять на интенсивность и тип передачи сигналов (диффузный или локальный соответственно). Наностержни имели самую низкую Т2-релаксивность и менее эффективное накопление в опухолях, что приводило к плохим результатам МРТ в опухолях.

Несмотря на некоторую изменчивость между моделями мышей, общие результаты ясно указывают на то, что печень и селезенка захватывали большинство НЧ, что согласуется с несколькими предыдущими работами [332,343–345]. Так, через 24 ч после обработки НЧкуб, НЧст и НЧкл печень накапливала  $74\pm12$  %,  $50\pm9$  % и  $70\pm6$  % введенной дозы и селезенка -  $20\pm3$  %, 11±3 %, 21±4 % введенной дозы, соответственно. Более низкая скорость поглощения НЧст печенью и селезенкой, вероятно, связана с более низкой секвестрацией удлиненных наночастиц макрофагами по сравнению с аналогами другой формы [331]. В отличие от предыдущих работ, НЧкуб не накапливались ни в почках [343], ни в сердце и легких. В некоторых моделях мышей мы обнаружили НЧкуб в этих органах, однако это были случайные события. При этом значительное количество НЧст было обнаружено в легких – 17,1% введенной дозы во всех исследованных моделях, что сравнимо со эффективностью захвата в селезенке. Есть лишь несколько сообщений, показывающих наличие внутривенно введенных НЧ в легких [346,347]. Например, 9-нм НЧ, модифицированные димеркаптоянтарной кислотой (ДМСК), накапливались преимущественно в легких после внутривенного введения. [348,349]. Авторы предположили, специфическое что ЭТО

нацеливание было связано с химией поверхности, но точный механизм остается неясным. Направленные ICAM-1 сферы субмикронного размера и эллиптические диски также эффективно доставлялись к эндотелиальным клеткам легких, однако здесь свою роль сыграло наличие адресной молекулы [350]. В текущем исследовании НЧст не были функционализированы специфическими лигандами, и накопление НЧст в легочных капиллярах может быть связано с поведением наностержней, вращающихся в потоке, что приводит к снижению скорости потока и миграции к стенке сосуда и, таким образом, увеличивает вероятность адгезии НЧст к эндотелиальным клеткам [350]. Поскольку легкие являются первым фильтром для внутривенно вводимых частиц, естественно, что значительная часть НЧст оседала в легочных капиллярах. Накопление НЧст в легких можно использовать для визуализации легких или доставки лекарств к первичным опухолям или метастазам легких. Хотя предыдущее исследование на грызунах показало, что скорость клиренса наночастиц зависит от типа линии мышей [351], мы не обнаружили каких-либо существенных различий профилях В биораспределения ни между BALB/с и C57bl /мышами линии, ни у здоровых мышей, ни у мышей с опухолями.

Накопление НЧ посредством эффекта повышенного захвата И различается опухолей удержания сильно среди В зависимости OT местоположения, размера и структуры/гистологии. Например, быстро растущие опухоли имеют больше дефектных сосудов, что способствует усиленной экстравазации НЧ. Соотношение между паренхимой опухоли и стромой определяет консистенцию и натяжение опухолевой ткани, что влияет на лимфодренаж [352]. Использование нескольких моделей опухолей очень удобно для всестороннего анализа биоэффективности НЧ. В текущем исследовании впервые было оценено поглощение НЧ на трех разных моделях опухолей мышей. И МРТ, и АЭС выявили максимальное накопление НЧ в опухолях В16. Известно, что ортотопические опухоли более эффективно накапливают НЧ, чем гетеротопические [334]. Скорее всего, подкожная имплантация обеспечивает естественную микросреду для клеток меланомы, что приводит к более высокой скорости поглощения по сравнению с гетеротопическими имплантатами клеток рака толстой кишки и рака молочной железы.

Динамика опухолевого накопления существенно различается для разных наночастиц. Так, максимальное поглощение ПЭГилированных золотых наносфер и наноклеток наблюдалось через 24 часа после внутривенного введения, тогда как нанодиски достигали пика накопления в опухолевых тканях через 6 часов после введения [303]. Изучение доставки НЧ тканям имеет решающее значение для К опухолевым определения оптимального момента времени для диагностики опухолей на основе МРТ. Вероятно, из-за увеличенного периода полувыведения НЧкуб и НЧкл постепенно накапливаются в большинстве опухолей до 24 часов, что приводит к лучшей скорости поглощения и лучшим результатам МРТ по сравнению с НЧст. Последние демонстрировали максимальную скорость накопления в течение первых 30 минут после инъекции без значительного увеличения в более поздние моменты времени [304]. Ранее было показано, что удлиненные наночастицы более эффективно избегают неспецифического захвата клетками Купфера по сравнению с наночастицами другой формы, демонстрирующими длительное кровообращение и распределение в определенных органах или участках опухоли [331]. Действительно, в текущем исследовании накопление НЧст в селезенке и печени было ниже, чем у других НЧ, но частицы были нацелены на легкие, а не на опухоли. Быстрый клиренс НЧст является наиболее вероятным объяснением низкой эффективности доставки НЧст и плохого МР-контрастирования. Также наностержни могут иметь более короткие периоды полувыведения из-за более низкой плотности покрытия цепями ПЭГ на их поверхности [303].

Эффективность доставки к месту опухоли является ключевым параметром для диагностики и терапии рака на основе НЧ. Хотя многочисленные исследования были сосредоточены на улучшении доставки

наночастиц, только около 0,9% введенной дозы накапливается в опухолях [334]. В текущей работе 2,94% инъецированных НЧкл и 3,79% инъецированных НЧкуб оказались в исследованных опухолях, а для меланомы В16 скорость поглощения была еще выше (4,8 и 6,6% введенной дозы соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о том, что эти НЧ перспективны не только для диагностики, но и для адресной доставки лекарств.

Общепризнано, что НЧ обладают высокой биосовместимостью, что делает их привлекательными для медицинского применения [345,353,354]. Для обеспечения безопасности исследуемых НЧкуб, НЧст и НЧкл мы провели исследования цитотоксичности на фибробластах мышей. Нормальные клетки предпочтительны для тестов in vitro, поскольку раковые клетки обладают рядом специфических характеристик, делающих их менее чувствительными к некоторым токсическим эффектам, опосредованным НЧ. Исследования in vitro не показали какой-либо токсичности исследуемых НЧ в концентрациях до 200 мкг/мл, что согласуется с многочисленными сообщениями [336,337,343,355]. Для визуализации опухолей мы использовали стандартную дозу Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 5 мг/кг, что соответствует уровню в плазме 200 мкг/мл у 20-граммовых мышей. Эта доза хорошо переносилась в соответствии с предыдущими исследованиями, в которых внутривенная инъекция 5, 10 и 20 и даже 100 мг/кг железа была [344,353,354,356,357]. признана безопасной y грызунов В ранних токсикологических исследованиях в экспериментах на животных не наблюдалось острой токсичности при концентрациях до 168 мг Fe/кг [358]. Исследования биораспределения показали, что инъекционная доза, используемая для МРТ, ниже, чем общее содержание железа в организме. Так, через 24 ч после введения мышам BALB/с концентрация железа в печени, в которой преимущественно накапливается НЧ, увеличилась со 137±17 до 229±17, 192±17 и 238±17 мкг/г для НЧкуб, НЧст и НЧкл соответственно. Эти концентрации значительно ниже уровня, необходимого для развития цирроза и/или гепатоцеллюлярной карциномы (4000 мкг/г). В совокупности данные свидетельствуют о том, что изученные НЧ биосовместимы и безопасны для биомедицинских целей.

#### 3.5 Применение НЧ в тераностике

МРТ является неинвазивным методом, МРТ дает воспроизводимые и надежные результаты и широко используется для диагностики опухолей. Этот метод позволяет контролировать доставку лекарственного средства, учитывая, что молекула конъюгирована с контрастным веществом для МРТ. Магнитные наночастицы сочетают в себе как диагностическую, так и функцию носителя лекарств [359,360] и изменяют биораспределение, увеличивая доставку к злокачественным тканям [359,361]. Типичная ΗЧ состоит ядра ИЗ содержащего магнитные оксиды железа и покрытия из биосовместимых полимеров [362–364]. Магнитное ядро обладает магнитным моментом, позволяющим проводить МРТ-контрастирование [365-367], тогда как полимерное покрытие обеспечивает сайты связывания для функционализации НЧ лекарствами, красителями и специфическими лигандами. Таким образом, НЧ являются перспективным материалом для реализации концепции тераностики, где диагностическая и терапевтическая компонента объединены в одном препарате. При этом надо четко понимать, что преимущества концепции тераностики реализуются только в том случае, когда успех терапии зависит от оценки накопления терапевтического препарата, а использование одного и того же препарата отдельно в диагностике и терапии не является оправданным ни с точки зрения экономики, ни с точки зрения эффективности. Чтобы показать перспективы применения НЧ в качестве тераностических препаратов, нами было предложено решить две проблемы: 1) оценка эффективности доставки ФС в опухолевый очаг 2) оценка эффективности доставки таргетных препаратов в опухолевый очаг.

Оценка эффективности доставки ФС является важной проблемой в фотодинамической терапии. Зависимость эффективности терапии от точно определенного времени максимального накопления ФС в опухоли диктует необходимость использования методов мониторинга концентрации ФС в опухоли в ФДТ. В отличие от флуоресцентной визуализации МРТ широко используется для диагностики in vivo, и корреляция между двумя методами позволяет отслеживать динамику накопления ФС с помощью МРТ. Хотя ФС, циркулирующий в сосудистой сети опухоли, может способствовать индуцированной светом гибели раковых клеток [368–371], концентрация ФС в опухолевых тканях также считается важной для исхода ФДТ [372–374]. Таким образом, мониторинг доставки лекарств к месту опухоли необходим временных рамок облучения. Эффект повышенной для оптимизации проницаемости и удерживания (ЭПР) является основным механизмом накопления наночастиц в опухолях [375]. Точно установлено, что эффект ЭПР может различаться у разных типов опухолей и пациентов, определяя динамику и эффективность доставки лекарств на основе НЧ [334]. Эффективность загрузки, определенная как отношение между загруженным лекарственным средством и общей массой системы, была значительно выше ( $22,4 \pm 0,9$  %), чем описано ранее для аналогичной системы доставки (1,54 %) [362]. Из-за высокой гидрофобности ФС в водных средах [367] склонны образовывать агрегаты с пониженной фотоактивностью. Однако сравнение спектров поглощения НЧ-СА@ФС и молекулярного ФС не выявило каких-либо изменений, свидетельствующих о снижении фотоактивности ΦC В комплексах. Основываясь на размере ядра оксида железа (6,2 нм) и гидродинамическом диаметре НЧ-СА@ФС (83,1 нм), мы предположили, что каждый комплекс состоит из нескольких МНЧ, инкапсулированных в оболочке ЧСА с молекулами ФС, абсорбированными в оболочке ЧСА.

Для понимания поведения как носителя, так и препарата HЧ-CA@ФС изучали биораспределение и доставку в опухоль в динамике. После внутривенного введения МРТ выявила пик накопления МНЧ в опухолях примерно через 1ч, что было подтверждено методом АЭС. Более того, этот момент времени совпал с максимальным накоплением ФС в опухолях, что

подтверждает идею о возможности использования МРТ для отслеживания ФС in vivo. Контрастирование глубоких опухолей Т2 свидетельствовало о высокой эффективности доставки НЧ-СА@ФС, и действительно, измерения концентрации железа показали, что через 1 ч после введения опухоли накапливали до 7,8 % от общей введенной дозы, что было намного выше, чем сообщалось ранее для большинства НЧ [376].

Улучшив все три компонента (ёмкость загрузки, МРТ-контрастирование и эффективность доставки), мы провели эксперимент с целью показать эффективность разработанной тераностической системы в экспериментах in vivo. В соответствии с данными МРТ облучение опухолей в ранние сроки (0,5-1 ч) более эффективно ингибировало рост опухоли, чем ФДТ выполненная при 4 часах после инъекции. Общее количество препарата в опухоли включает как внутрисосудистую (циркулирующую), так И внесосудистую (интерстициальную) фракции, и активация ФС в этих двух компартментах отвечает за выключение сосудов и прямой цитотоксический эффект соответственно. Обычно максимальные значения концентрации МНЧ в крови наблюдаются сразу после инъекции, после чего происходит постепенное снижение в зависимости от физических характеристик МНЧ и модификации поверхности, определяющих период полувыведения. Так, через 1 ч после обработки обнаружено 10-кратное падение концентрации НЧ-СА@ФС в крови. На основании фармакокинетики ФС в крови можно предположить, что применение ФДТ сразу после введения МНЧ является универсальным подходом. Тем не менее, облучение через 1 час после инъекции давало лучший ответ по сравнению с 30-минутной группой. Что более важно, облучение ФС кровотоке может привести цитотоксическим эффектам. В В К предварительных экспериментах ФДТ, запланированная через 30 мин после введения НЧ-СА@ФС с повышенной плотностью энергии (150 Дж/см2), приводила к выраженной токсичности, тогда как при облучении в более поздние моменты времени побочных эффектов не наблюдалось. Кроме того, следует отметить, что большинство ксенотрансплантатных опухолей (включая СТ26) васкуляризированы только по краям и имеют обширные участки B гипоксического ядра. этом случае (в отличие ОТ высоковаскуляризированных опухолей) сосудистый коллапс не является первичным механизмом противоопухолевого ответа и, скорее всего, именно накопление ФС в ткани определяет исход ФДТ. Пассивная доставка НЧ к опухоли основана на эффекте повышенной проницаемости и удерживания, а концентрация МНЧ в злокачественных тканях увеличивается в зависимости от времени, пока не достигнет плато. Поскольку накопление ФС в тканях увеличивается со временем, а уровень ФС в крови снижается, необходимо чтобы обеспечить найти как безопасность, компромисс, так И противоопухолевый ответ. Оптимальный временной интервал между введением нанопрепарата и облучением может различаться в зависимости от опухоли, пациента и даже каждой отдельной опухоли с течением времени, эффективности ΦДТ крайне необходим поэтому для повышения персонализированный подход. В настоящей работе показано, что НЧ, покрытые ЧСА: 1) эффективно иммобилизуют молекулы ФС; 2) доставляют к опухолям до 17% введенной дозы/г ткани; 3) обеспечивают точное отслеживание методом МРТ накопления лекарства в злокачественных новообразованиях; 4) Позволяют подобрать время облучения, приводящее к наиболее значительному ингибированию роста опухоли. В целом результаты показывают, что синтезированный НЧ-СА@ФС в сочетании с МРТ является перспективным подходом для тераностики рака на основе ФДТ.

В случае использования НЧ для доставки лекарственных препаратов на первый план выходит способность НЧ взаимодействовать с лекарственными препаратами с помощью слабых взаимодействий, таких как электростатические и гидрофобные взаимодействия, а также способность НЧ опухолевого очага. Из всех исследованных НЧ наиболее достигать перспективными с этой точки зрения являются НЧ-СА-40-ПЭГ. За счет наличия белкового покрытия из человеческого сывороточного альбумина удается получить НЧ, которые: 1) позволяют избегать быстрого захвата

195

макрофагами печени, благодаря наличию молекул ПЭГ; 2) обеспечить прочное взаимодействие лекарственных препаратов с молекулами белка за счет комбинации электростатических и гидрофобных взаимодействий; 3) позволяют легко проводить модификацию векторными молекулами, например иммуноглобулинами. Основным недостатком подобных НЧ можно отметить жесткую необходимость использования метода разложения ацетилацетоната железа в бензиловом спирте в качестве единственного метода получения магнитных ядер, так как пока нами не было обнаружено способности магнитных ядер, полученных любым другим методом, к сорбции молекул СА из водного раствора. НЧ, полученные данным методом хоть и позволяют визуализировать опухоль на МРТ, но обладают не самыми высокими значениями T2 релаксивности, однако за счет малого размера и длительного времени циркуляции в крови успешно преодолевают барьеры на границе кровь-опухоль и эффективно проникают в саму опухолевую ткань.

Для обеспечения активной адресной доставки противоопухолевого препарата с целью повышения его противоопухолевой эффективности необходимо получить наноноситель с высокой специфичностью к раковым клеткам. В качестве наноносителя были выбраны магнитные наночастицы оксида железа, покрытые БСА и ПЭГ и конъюгированные с моноклональными антителами к VEGF. Наши эксперименты на фиксированной культуре клеток 4T1 показали, что HЧ-CA-VEGF способны связываться с клетками 4T1 со значительно большей эффективностью, чем НЧ-СА-IgG. Тем не менее, эти результаты были получены на фиксированных формальдегидом клетках, в которых клеточная мембрана обладает высокой проницаемостью для иммуноглобулинов, белков, которые не будут доступны в случае живой клетки. Хорошо известно, что VEGF синтезируется в растворимой форме во внутриклеточном матриксе, а затем высвобождается во внеклеточное пространство, где связывается со своими рецепторами. Но также было показано, что сверхэкспрессия VEGF приводит к его накоплению в клеточной мембране. Связывание VEGF с рецепторами на клеточной поверхности по-

196

прежнему позволяет свободно презентовать некоторые из эпитопов и, таким образом, действовать как антиген для связывания антител. Поэтому для количественного анализа взаимодействия наноносителей с живыми клетками нами была проведена проточная цитометрия. Результаты показали, что HЧ-CA@Докс-VEGF также более эффективно накапливаются в клетках 4T1 по сравнению с НЧ-СА-ПЭГ и НЧ-СА-IgG.

Высокая аффинность HЧ-СА@Докс-ПЭГ-VEGF к опухолевым клеткам приводила к повышению эффективности доставки Докс в ядра клеток аденокарциномы. Мы полагаем, что это может быть результатом улучшенного связывания НЧ, нацеленных на VEGF, с клеточной мембраной. Будучи прикрепленным к клеточной поверхности, НЧ-СА@Докс-ПЭГ-VEGF создает гораздо более высокую локальную концентрацию Докс вокруг опухолевой клетки, тем самым увеличивая зависимую от концентрации диффузию Докс через клеточную мембрану и дальнейшее связывание с ДНК в ядре. Также отсутствие, как связывания НЧ-СА@Докс-ПЭГ-IgG с мембраной, так и накопления Докс в ядрах указывает на то, что низкое связывание НЧ с клеточной поверхностью препятствует высвобождению и транспорту Докс мембрану через В ядро, ЧТО снижает потенциал препарата как противоопухолевого агента.

Предыдущие исследования данных фармакокинетики И биораспределения наночастиц оксида железа показали, что время циркуляции в крови магнитных наночастиц зависит от многих факторов, среди которых ключевую роль играют два: гидродинамический размер и химический состав покрытия. Было показано, что при уменьшении размера наночастиц свыше 40 нм время кровообращения резко увеличивается [377]. ПЭГилирование — еще один метод, позволяющий избежать захвата ретикулоэндотелиальной системой (РЭС) наночастиц из кровотока, что увеличивает их концентрацию в крови [378]. Мы попытались оптимизировать оба этих параметра: 1) размер используемых нами магнитных наночастиц, покрытых СА, был менее 50 нм; 2) все типы магнитных наночастиц были пегилированы для обеспечения

эффективной загрузки Докс и предотвращения взаимодействия с белками плазмы. Однако эта стратегия только теоретически должна увеличивать время кровообращения, и реальные значения должны быть оценены. Анализируя процесс кровообращения, ΜЫ отметили, что элиминация магнитных характеризуется фазами: наночастиц двумя первая составляющая соответствует быстрой элиминации магнитных наночастиц в первый час, а вторая компонента соответствует пулу более длительно циркулирующих магнитных наночастиц. Расчетное время полужизни в крови было сопоставимо с другими контрастными агентами на основе оксида железа, о которых сообщалось ранее, и значительно выше, чем значение клинически одобренных наночастиц оксида железа, покрытых декстраном (AMI125) [379]. Эти данные предполагают достаточно длительное время циркуляции МНЧ для доставки в опухоль и обеспечения эффективного связывания с опухолевыми клетками.

Для успешной диагностики опухолей в экспериментах *in vivo* магнитные наночастицы должны не только связываться с опухолевыми клетками, но и давать сильный сигнал в месте опухоли после эффективного связывания. Чтобы оценить эту способность, были получены МРТ-изображения в режиме SWI мышей с опухолями 4T1 после внутривенного введения. В случае модели опухоли 4Т1 опухолевая масса очень плотная и плотно заполнена опухолевыми клетками. Во всем опухолевом теле не наблюдается эффективного накопления НЧ сразу после в/в введения, что означает недостаток кровоснабжения глубоко расположенных участков опухоли, иначе сосуды, кровоснабжающие опухоль, будут сильно гипоинтенсивными из-за высокой концентрации МНЧ в крови. Однако через 24 ч после введения НЧ-СА@Докс-ПЭГ-VEGF наблюдается высокое накопление наночастиц на границе аденокарциномы, что приводит к локальному падению интенсивности сигнала. В случае растущих опухолей это область, где происходит наиболее инвазивный рост и активный ангиогенез. Накопление нецелевых магнитных наночастиц в этой области в основном наблюдается за счет пассивного

198

таргетирования эффектом ЭПР, тогда как для HЧ-CA@Докс-ПЭГ-VEGF наблюдается гораздо более сильное падение интенсивности сигнала за счет дополнительного эффекта активного таргетинга моноклональными антителами к VEGF. Это наблюдение также подтверждается разницей между значением CNR для HЧ-CA@Докс-ПЭГ-VEGF и других HЧ, которая была значительно выше для HЧ-CA@Докс-ПЭГ-VEGF.

Во время терапевтического эксперимента мы использовали в качестве контроля PBS, свободное лекарство и НЧ-СА@Докс в качестве контроля. Мы предположили увеличение продолжительности жизни животных, которых лечили свободным лекарственным средством и НЧ-СА@Докс, однако, мы не обнаружили различий в медиане выживаемости между PBS, Докс или НЧ-СА-Докс. Как показали МРТ-эксперименты, после в/в введения в опухоли обнаруживались только НЧ-СА@Докс-ПЭГ-VEGF. Мы считаем, что только концепции адресной доставки обеспечивает эффективное реализация поглощение НЧ опухолевыми клетками. Результаты химиотерапии мышей-4T1 носителей аденокарциномы подтвердили, что конъюгация монокллональных антител к VEGF с НЧ-СА@Докс приводит не только к увеличению накопления наноносителя в очаге опухоли, но и увеличивает выживаемость. Другими словами, увеличение специфического транспорта противоопухолевого агента к раковым клеткам, подтвержденного МРТ, приводит к повышению эффективности терапии. Также, мы показали, что у животных, получавших НЧ-СА-Докс@-ПЭГ-VEGF, значительно увеличилась продолжительность жизни. Мы полагаем, что это связано с высоким метастатическим потенциалом модели опухоли 4T1. Большинство животных погибали от метастазов, а добавление НЧ-СА@Докс-ПЭГ-VEGF снижало метастатический потенциал растущих первичных опухолей. Измерение массы тела не показало значительного снижения массы тела, что позволяет сделать вывод о том, что токсичность НЧ, нагруженных Докс, по крайней мере, сравнима со свободным лекарством или даже ниже. Модификация магнитных наночастиц VEGF повышает их специфичность к опухолевой клетке и облегчает доставку Докс в ядро. Покрытие магнитных наночастиц СА и ПЭГ обеспечивает стабильную защиту от захвата клетками РЭС и обеспечивает длительную циркуляцию в крови. Внутривенное введение магнитных наночастиц, нацеленных на VEGF, позволяет как визуализировать опухоль с помощью MPT, так и проводить терапию опухоли за счет активного нацеливания противоопухолевого препарата доксорубицина, загруженного в наночастицы.

МГТ требует оптимизации свойств наноматериалов, чтобы обеспечить контролируемое повышение температуры во время воздействия ПМП. Следовательно, НЧ должны демонстрировать высокие значения SLP, которые сильно зависят от их собственных магнитных свойств. Наиболее широко используемые НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, например, показывают высокие значения SLP для диаметров более 20 нм, в то время как для магнитно анизотропного  $CoFe_2O_4$ аналогичные значения могут быть достигнуты при диаметре около 10 нм, что составляет всего 13% объема НЧ. По сравнению с суперпарамагнитными частицами ферримагнитные или ферромагнитные МНЧ более перспективны для применения МГТ, так как основную часть нагрева обеспечивают потери Нееля. Их реакция на ПМП может быть дополнительно улучшена за счет включения таких ионов, как Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>, в ферриты на основе оксида железа. С биологической стороны стабильность в физиологических условиях и биосовместимость играют важную роль при выборе НЧ. Наночастицы феррита просты в изготовлении, стабильны в биологических обладают низкой [380]. условиях И относительно токсичностью Синтезированые покрытые цитратом наночастицы CoFe2O4 нами продемонстрировали высокие значения SLP 300–500 Вт\*г-1 в воде и агарозе, что делает их перспективными кандидатами для МГТ [381]. Полученные наночастицы позволяют быстро и точно регулировать температуру в тканях параметров  $\Pi M \Pi$ . ФК обладают улучшенной путем коррекции биосовместимостью по сравнению с ферритами на основе Ni и Zn. Таким образом, в отличие от ФК, НЧ NiFe2O4 и ZnFe2O4 приводят к значительной гибели клеток и продукции АФК даже при концентрациях 100 мкг/мл [382,383].

Общеизвестно, что гипертермия приводит к апоптозу или некрозу в зависимости главным образом от клеточных линий и температуры нагревания. °C Интересно, что данные о влиянии нагревания при 43 весьма противоречивы. Как правило, это приводит к активации апоптоза [384]. Ранее было показано, что в некоторых клеточных линиях при мягкой гипертермии наблюдается незначительное увеличение клеток, находящихся в состоянии некроза и апоптоза, тогда как большая часть клеточной популяции остается жизнеспособной [385]. Предполагается, ЧТО ЭТИ клетки способны восстанавливаться после теплового шока. В настоящей работе показано, что 42-43 °C ΜΓΤ активирует продукцию АФК клетками обеих при исследованных опухолевых культур, но не вызывает немедленной гибели клеток. Тем не менее, легкая МГТ приводит к гибели всей популяции клеток СТ26 по путям апоптоза и некроза уже через сутки после нагревания, в то время как многие клетки 4T1 остаются живыми. Известно, что опухолевые клетки продуцируют АФК в повышенных концентрациях, что способствует прогрессированию опухоли, однако эти клетки также экспрессируют повышенные уровни антиоксидантных белков [386,387]. Таким образом, можно предположить, что клетки 4T1 и CT26 имеют различный уровень экспрессии или, что более важно, различную активность антиоксидантных белков и, как следствие, демонстрируют разную реакцию на повышение АФК, производимых при МГТ при 42-43°. С. Однако исследование активности каталазы, участвующей в детоксикации высоких концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не выявило существенных различий между этими клеточными линиями. Следует отметить, что в агрессивных опухолях повышенный уровень АФК может приводить к росту опухоли и метастазированию [387]. Таким образом, можно предположить, что метастатические клетки 4T1 более устойчивы к повышенному уровню АФК, чем неметастатические клетки СТ26. Наконец, группой Жу было продемонстрировано, что уровень АФК в клетках 4T1 не коррелировал с активацией гибели клеток. Таким образом, токсический порог АФК до сих пор полностью не определен и требует дальнейшего изучения [388]. Другим возможным объяснением различий между реакцией клеток 4Т1 и СТ26 на умеренную МГТ может быть экспрессия белков теплового шока (Hsp). Hsp70 обеспечивает лучшую устойчивость клеток к тепловому стрессу [389]. коллегами продемонстрировали, Стэнгл с что клетки 4T1 демонстрируют более высокий уровень цитозольного Hsp70 по сравнению с клетками СТ26 in vitro и in vivo [390]. Таким образом, совокупность обсуждаемых различий между клетками 4T1 и CT26 хорошо объясняет их реакцию на МГТ при 42-43 °C. Результаты in vivo также выявили разницу между мягкими эффектами МГТ на двух моделях опухолей, подтверждая чувствительность опухолевых различную клеток к нагреванию, продемонстрированную in vitro. Лечение при 42-43 °C только замедляло скорость роста опухолей 4T1, но не предотвращало рецидивов, в то время как 100% опухолей СТ26 были излечены. Следовательно, гипертермия 42-43 °С не полностью уничтожает клетки 4T1 in vivo, и даже небольшая часть выживших клеток может привести к повторному росту опухоли. Напротив, мягкая МГТ убивает всю популяцию клеток СТ26 *in vitro* и приводит к полной регрессии опухоли in vivo. Кроме того, модель опухоли 4T1 является слабо иммуногенной [391], в отличие от опухолей СТ26 [392]. В результате противоопухолевый иммунный ответ, потенциально вызванный гибелью опухолевых клеток при легкой МГТ, может вносить дополнительный вклад в клиренс опухоли СТ26, а не 4T1.

Гипертермия (термическая абляция) при более высоких температурах (≥47 °C) вызывает некроз. Однако некоторое количество апоптотических клеток также обнаруживается в клеточной популяции после гипертермии 47– 50 °C [393]. В соответствии с этими данными наше исследование показало, что при МГТ активация некротической запрограммированной клеточной гибели большинства клеток 4T1 и CT26 сразу после нагревания и приводила к полной гибели клеточных популяций через 24 ч после обработки ПМП *in vitro*. Эти

данные хорошо коррелируют с результатами *in vivo*. При терапии опухоли 4T1 МГТ при более высокой температуре наблюдалось более эффективное замедление роста первичной опухоли. Таким образом, разные опухолевые клетки имеют разную чувствительность к температуре. Для гибели клеток 4Т1 in vitro и устранения первичных опухолей in vivo требуется повышенная температура нагрева (≥47 °C) по сравнению с клетками СТ26, которые эффективно лечатся мягкой МГТ. Поэтому крайне важно определить индивидуальную температуру МГТ для каждого конкретного типа опухоли, чтобы обеспечить эффективность терапии. Кроме того, поскольку наши данные in vitro хорошо коррелируют с результатами in vivo, можно предположить, что клетки, выделенные из опухолей пациентов, могут быть определения использованы лля оптимального режима нагрева персонализированным образом. Хотя нагревание опухолей 4T1 при 58-60 °C продемонстрировало более высокие показатели выживаемости по сравнению с МГТ при 46-48 °С, выявляемая во время терапии утечка МНЧ из первичной опухоли в окружающие ткани приводила к нежелательным побочным эффектам. Таким образом, представляется разумным, что нагрев опухоли при 46-48 °С является оптимальным режимом для терапии опухолей 4T1. Недавно Ву и соавт. предложили гидрогель термочувствительной магнитной наноэмульсии для предотвращения диффузии МНЧ из опухоли в окружающие ткани [394]. Затвердевание гидрогеля при 37 °С ограничивает миграцию МНЧ в месте инъекции. Используя этот подход, необходимо дополнительно исследовать противоопухолевую активность МГТ при 58-60 ° С. Поскольку у мышей, несущих 4T1, метастазы развивались даже в случае регрессии первичной опухоли после МГТ или хирургического удаления то на основании предыдущих результатов можно сделать вывод, что опухоли 4T1 могут метастазировать до начала терапии. Однако стоит подчеркнуть, что МГТ оказалась более эффективным подходом, чем оперативное вмешательство. Возможно, что улучшенная противоопухолевая активность частично связана с ингибированием роста ранее существовавших вторичных опухолей из-за

противоопухолевого активации системного ответа ΜΓΤ [395–397]. Опухолевые клетки, убитые МГТ, возможно, высвобождают связанные с повреждением молекулярные паттерны, которые активируют иммунную систему. Таким образом, комбинированная терапия рака, включающая гипертермию и иммунотерапию, представляется наиболее перспективным подходом к лечению опухолей и требует дальнейшего изучения. В заключение мы показали, что МГТ по-разному влияет на опухолевые клетки *in vitro* и *in* vivo в зависимости от температуры воздействия. Активация гибели клеток увеличивается с температурой. Важно отметить, что отсроченный эффект мягкой МГТ различается в разных клеточных линиях. Более того, МГТ при 42-43 °С неэффективна для лечения метастатической опухоли 4T1, в то время как она эффективна для лечения неметастатических мышей, несущих СТ26. Термическая абляция увеличивает долгосрочную выживаемость мышей, несущих 4T1, обеспечивая клиренс первичной опухоли и ингибирование метастазирования. Таким образом, определение температуры терапии для каждого вида опухоли в отдельности может обеспечить успех МГТ в качестве противоопухолевой монотерапии.

#### 4 Экспериментальная часть

#### 4.1 Материалы

Ацетилацетонат железа (III) (Fe(acac)<sub>3</sub>; ≥ 99,9%), хлорид железа (III) (FeCl<sub>3</sub>; 97%), 1,2-гексадекандиол (1,2-ГДД, 90%), циклопропанкарбоновая кислота (95%), циклобутанкарбоновая кислота(98%), циклопентанкарбоновая кислота (99%), циклогексанкарбоновая кислота (98%), бензойная кислота (≥ 99,5%), бифенил-4-карбоновая кислота (95%), олеиновая кислота (ОА, 90%), олеиламин (ОАт, 70%), дибензиловый эфир (≥ 98%), 1-октадецен (≥ 95%), разветвленный полиэтиленимин (ПЭИ,  $M_w = 25000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ ), гидрат гидразина  $(N_2H_4 \cdot H_2O, 50 - 60\%)$ , гидроксид натрия (NaOH,  $\geq 97,0\%$ ), соляная кислота (HCl, 37%), азотная кислота (HNO<sub>3</sub>, 65%), этанол (95%), ацетон (99%), нгексан (≥ 98,0%), 2-пропанол (≥ 99,8%), дихлорметан (≥ 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 (≥ 99,0%), Pluronic F-68 и F-127, N-(NHS, 98%), N-(3-диметиламинопропил)-N'гидроксисукцинимид этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC, ≥ 99,0%), безводный карбонат калия  $(K_2CO_3; \ge 99\%), 3,4$ -дигидроксифенилуксусная кислота (ДФУК, 98%) и поли(этилен гликоль) 2-аминоэтиловый эфир уксусной кислоты (NH<sub>2</sub>-PEG-СООН,  $M_{\rm w} \sim 1100 \ {\rm \Gamma}$ ·моль<sup>-1</sup>) 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.

Изображения электронной дифракции (ЭД), изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) светлого поля и изображения сканирующей просвечивающей темнопольной электронной микроскопии (High Angle Annular Dark Field Scanning Transmission Electron Microscopy, HAADF-STEM) были получены на просвечивающем электронном микроскопе Titan Themis Z, оборудованном корректором сферических аберраций конденсорной системы DCOR+, при ускоряющем напряжении 200 кВ [398].

Рентгеноструктурный анализ сухих порошков НЧ осуществляли при комнатной температуре с использованием дифрактометра DRON-4 с Со  $K_{\alpha}$  излучением. Сбор данных производился при значениях угла дифракции  $2\theta = 20 - 100$  ° при скорости сканирования  $0.1^{\circ}$  за шаг и 3 с на одну точку. Качественный фазовый анализ был проведен путем сравнения полученных результатов с базой данных PHAN [293].

Кривые намагничивания и петли гистерезиса были зарегистрированы с использованием многофункционального автоматизированного комплекса Quantum Design PPMS DynaCool, оснащенного опцией виброметрической магнитометрии (VSM) [293].

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 °C ·мин<sup>-1</sup> в атмосфере аргона [293].

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<sup>-1</sup> методом прессования таблеток с KBr [293].

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 мг·мл-1 [308]

Мёссбауэровские спектры образцов НЧ были зарегистрированы с помощью электродинамического спектрометра CMS-1104Em, работающего в режиме постоянного ускорения. В качестве источника резонансного γ-облучения использовался <sup>57</sup>Co в родиевой матрице. Сдвиги изомеров определяли относительно α-Fe [293].

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 [Fe] = 0,1 - 2,0 мкг·мл<sup>-1</sup>. Для этого 10 мкл водного коллоида HЧ 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 [304].

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 r2-релаксации) водных коллоидов HЧ осуществляли при 18 °C с использованием MPтомографа 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 мм<sup>2</sup>. 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 [304].

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 HЧ (0 – 200 мкг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·мл<sup>-1</sup>), а также свободным красителем Cy5 (0,03 – 7,84 мкг·мл<sup>-1</sup>). 20 мкл реагента MTS (анализ нерадиоактивной пролиферации клеток CellTiter 96 AQueous, Promega, CША) добавляли в каждую лунку со 100 мкл культуральной среды и после 4 ч инкубации при 37 °C в темноте измеряли поглощение при 490 нм с использованием спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan GO. Каждый эксперимент проводился трижды [304].

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/с 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 [304].

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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·мл<sup>-1</sup>. 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 ΗЧ измерения Выявление уровней эндогенного железа. в моче экспериментальных животных проводилось путем введения высокой дозы НЧ (50 мг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·мл<sup>-1</sup>). 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 [304].

#### 4.2 Методы

#### Синтез сферических НЧсф

Синтез НЧ проводили в трёхгорлой тщательно высушенной и заполненной азотом колбе с обратным водяным холодильником, термометром и газовым инжектором. В колбу помещали 45 мл бензилового спирта и 2,18 г ацетилацетоната железа (III). Затем, при постоянном перемешивании, реакционную смесь продували азотом и медленно нагревали до температуры 383 К, после чего выдерживали 1 ч при данной температуре для выпаривания воды из раствора. Затем температуру реакционной смеси со скоростью 25 градусов в час поднимали до 473 К, и выдерживали при данной температуре 0-40 часов. Через 0-40 часов реакционную смесь медленно охлаждали до комнатной температуры, добавляли 90 мл безводного ацетона и отделяли НЧ центрифугированием при 2000 g в течении 10 минут Полученный осадок дважды промывали избытком ацетона, после чего высушивали на роторном испарителе до полного удаления ацетона.

#### Синтез НЧ куб размером 10, 15, и 20 нм

Кубические НЧ магнетита различного размера были синтезированы термическим разложением предварительно 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 FeCl<sub>3</sub>, 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;  $3 \times 50$  мл) и высушен при пониженном давлении с использованием вакуумного роторного испарителя.

Для синтеза кубических НЧ магнетита 1,3 ммоль ОК было растворено в 33 мл 1-октадецена, в то время как количество NaOL и Fe(OL)<sub>3</sub> варьировалось. Полученная смесь была предварительно нагрета до 140 °C 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 °C со скоростью 4 °C·мин<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, 1 ч). После центрифугирования осадок из КНЧМ был редиспергирован в 30 мл н-гексана или хлороформа.

## Синтез НЧ куб размером 30 нм

Смесь Fe(acac)<sub>3</sub> (0,5 ммоль), 1,2-HDD (4 ммоль), OK (8 ммоль), OAm (2 ммоль) и дибензиолового эфира (10 мл) была предварительно нагрета до 130 °C в токе аргона при непрерывном перемешивании и выдерживалась при данной температуре в течение 1 ч. Далее раствор был нагрет до температуры кипения (296 °C) со скоростью 3 °C·мин<sup>-1</sup> и выдерживался в течение 4 ч. По окончании реакции коллоидный раствор наночастиц был охлаждён до комнатной температуры, а сами наночастицы были выделены путем центрифугирования (6000 об·мин<sup>-1</sup>, 30 мин) после добавления 10 мл смеси 2-пропанол – н-гексан (v/v = 1/1) и редиспергированы в 20 мл ДХМ.

#### Синтез НЧкл

Смесь Fe(acac)<sub>3</sub> (2 ммоль), 1,2-HDD (8 ммоль) и различных органических кислот в дибензиловом эфире (20 мл) была предварительно нагрета до 130 °C в токе аргона при непрерывном перемешивании и выдерживалась при данной температуре в течение 1 ч. Далее раствор нагревали до 210 °C со скоростью 5 °C·мин<sup>-1</sup> и выдерживали при данной температуре в течение 1 ч, после чего нагревали до 260 °C с аналогичной скоростью и выдерживали еще в течение 30 мин. По окончании реакции, коллоидный раствор наночастиц был охлаждён до комнатной температуры, а сами наночастицы были выделены путем центрифугирования (6000 об·мин<sup>-1</sup>, 30 мин) после добавления 10 мл смеси 2-пропанол – н-гексан (v/v = 1/1) и редиспергированы в 20 мл ДХМ.

#### Синтез НЧст

#### Образец с шифром N.

Прекурсор – стержневидные НЧ акагенита (β-FeOOH), были синтезированы гидролизом FeCl<sub>3</sub> с добавлением высокомолекулярного ПЭИ (*M*<sub>w</sub> = 25 кДа). Для этого, 2 мл ПЭИ растворяли в 100 мл деионизированной

воды, после чего к полученному раствору добавляли 2,54 г FeCl<sub>3</sub>. Далее раствор нагревали до 80 °C при непрерывном перемешивании и выдерживали при данной температуре в течение 2 ч, после чего охлаждали до комнатной температуры и доводили значение pH до 7,0 при помощи 1M NaOH. Образовавшийся осадок наночастиц отделяли путем центрифугирования (6000 об ·мин<sup>-1</sup>, 30 мин) и промывали деионизированной водой (3 × 50 мл) с использованием центрифужных фильтров.

Затем коллоидный раствор стержневидных НЧ  $\beta$ -FeOOH ([Fe] = 3 мг·мл<sup>-</sup> <sup>1</sup>) 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 °C, удержание температуры в течение 30 сек и охлаждение до 35 °C) [308]. Полученные НЧст отделяли OT путем раствора центрифугирования (6000 об мин<sup>-1</sup>, 10 мин) и промывали деионизированной водой (3 × 50 мл) с использованием центрифужных фильтров.

#### Образец с шифром D

акагенита ( $\beta$ -FeOOH), Прекурсор – стержневидных ΗЧ были синтезированы гидролизом FeCl<sub>3</sub> в присутствии DOPA. Для этого 10 мл 0,05 М водного раствора FeCl<sub>3</sub> с смешивали с 1 мл водного раствора DOPA (1,6 мг∙мл<sup>-1</sup>), после чего к полученному раствору добавляли 180 ΜЛ деионизированной воды с температурой 80 – 90 °С. Реакционную смесь выдерживали при 90 °C в течение 2 ч при непрерывном перемешивании, после комнатной чего ee охлаждали ДО температуры. Для выделения образовавшегося прекурсора pH коллоидного раствора увеличивали до 7,4 добавления 1M NaOH. образовавшийся осадок путем отделяли центрифугированием (6000 об·мин<sup>-1</sup>, 10 мин) и промывали деионизированной водой  $(3 \times 50 \text{ мл})$  с использованием центрифужных фильтров (Millipore®) Amicon Ultra-4, 30 кДа).

Затем коллоидный раствор стержневидных НЧ  $\beta$ -FeOOH ([Fe] = 3 мг·мл<sup>-</sup> <sup>1</sup>) 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 °C, удержание температуры в течение 30 сек и охлаждение до 35 Полученные НЧст отделяли °C) [308]. ОТ раствора путем центрифугирования (6000 об·мин<sup>-1</sup>, 10 мин) и промывали деионизированной водой (3 × 50 мл) с использованием центрифужных фильтров.

#### Синтез НЧ ФК 1-4

Синтез НЧ CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> осуществлялся методом термического разложения металлосодержащих прекурсоров высококипящем растворителе В С добавлением поверхностно-активных веществ (ПАВ), обеспечивающих агрегативную стабильность НЧ в неполярных органических средах. Для этого, в 250 мл трехгорлую круглодонную колбу, снабженную магнитным якорем для перемешивания реакционной смеси, термопарой, обратным холодильником и подводом инертного газа – аргона, помещали смесь ацетилацетоната железа (III) (Fe(acac)<sub>3</sub>, 99%, Sigma-Aldrich), ацетилацетоната кобальта (Co(acac)<sub>2</sub>, 97%, Sigma-Aldrich), олеиновой кислоты (OA, 90%, Sigma-Aldrich), олеиламина (OAm, 70%, Sigma-Aldrich) и 40 мл дибензилового эфира (DE, 98%, Sigma-Aldrich). Вначале реакционную смесь барботировали аргоном с целью удаления кислорода и нагревали до 110 °C при интенсивном перемешивании (500 об·мин<sup>-1</sup>), после чего выдерживали температуру в течение 30 мин. Далее реакционный раствор нагревался до температуры кипения со скоростью 3 °С/мин и выдерживался при кипении в течение определенного промежутка времени. Для выделения НЧ из реакционной смеси полученный коллоидный раствор охлаждали до комнатной температуры, после чего НЧ отделяли от раствора путем центрифугирования (6000 об/мин,

30 мин), надосадочную жидкость декантировали, а образовавшийся осадок из НЧ перерастворяли в толуоле или хлороформе.

Контроль за размером получаемых НЧ осуществляли путем подбора концентрации прекурсоров, а также путем варьирования общей продолжительности реакции (Таблица 27).

Таблица 27 – Основные параметры реакций

Образец	Количест	Количест	Количе	Количе	Продолжи-	Размер НЧ
	во	во	ство	ство	тельность	по ПЭМ
	Fe(acac) <sub>3</sub> ,	$Co(acac)_2$ ,	OA,	OAm,	реакции,	(диагональ
	ммоль	ммоль	ММОЛЬ	ММОЛЬ	час	), нм
ФК-1	1	0,5	12	2	2	14
ФК-2	2	1	12	2	2	27
ФК-3	4	2	8	2	4	99
ФК-4	4	2	8	2	8	150

#### Синтез НЧ ФК-с

Для получения НЧ на первом этапе 1,62 г хлорида железа (III) (FeCl<sub>3</sub>;  $\geq$ 98 %, Sigma-Aldrich) растворяли в 20 мл деионизированной воды. К полученному раствору добавляли раствор 2,15 г гексагидрата хлорида кобальта (CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 98 %, Плазмотерм, Россия) в 2 мл деионизированной воды (Milli-Q water) и 0.5 мл соляной кислоты (HCl, 36 %, Сигма-Тек). Полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке в течение нескольких минут и добавляли по каплям к 100 мл 1 М раствора гидроксида натрия (NaOH,  $\geq$  98 %, Sigma-Aldrich), предварительно нагретого до температуры кипения. Кипение раствора поддерживали в течение 30 мин при непрерывном интенсивном перемешивании реакционной смеси. По истечении 30 мин, реакционную массу охлаждали, НЧ отделяли от раствора при помощи постоянного магнита и промывали деионизированной водой (3 раза по 100 мл). Далее к полученному осадку НЧ добавляли 315 мл 2 М азотной кислоты (HNO<sub>3</sub>, 65 %, Sigma-Aldrich), а также раствор 1,27 г нитрата железа (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, ≥ 98 %, Реактивторг) в 15 мл деионизированной воды. Полученный раствор доводили до кипения и удерживали при интенсивном перемешивании в

течение 1 часа. После этого реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, НЧ отделяли от раствора при помощи постоянного магнита и промывали 2 М раствором HNO<sub>3</sub> (3 раза по 100 мл). Полученный осадок НЧ редиспергировали в 50 мл деионизированной воды. На втором этапе к 50 мл раствора НЧ добавляли 10 мл 0,2 М раствора лимонной кислоты ( $C_6H_8O_7$ ; 98 %, Sigma-Aldrich), после чего рН раствора доводили до значения 7,4 при помощи 1 М раствора NaOH. Для того чтобы избавиться от избытка цитрат-ионов, нескоординированных на поверхности CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, полученный раствор наночастиц был промыт с использованием центрифужных фильтров

## Исследование эффективности магнитной гипертермии (МГТ) с использованием ФК *in vitro*

Исследование эффективности МГТ в условиях in vitro проводили на клетках линий CT26 (колоректальная карцинома мыши), 4T1 (карцинома молочной железы мыши) и SC-1 (эмбриональные фибробласты мыши). Клетки СТ26 (Cat. № CRL-2639), 4T1 (Cat. № CRL-2539) и SC-1 (Cat. № CRL-1404) были приобретены в американском банке клеточных культур ATCC (Manassas, VA, USA). Клетки линии CT26 культивировали в среде RPMI-1640 (gibco) с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка (FBS, gibco), 2 мМ Lглутамина (gibco), 1 мМ пирувата натрия (gibco) и 10 мМ ХЕПЕС (helicon). При культивировании клеток линии 4T1 использовали среду RPMI-1640 с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка и 2 мМ L-глутамина. Клетки линии SC-1 культивировали в среде DMEM (gibco) с содержанием 1 г/л глюкозы и с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка, а также 2 мМ Lглутамина. Все используемые в работе клеточные линии культивировали при 37 °С и 5 % СО<sub>2</sub> в инкубаторе (Sanyo). При постановке экспериментов клетки снимали с субстрата с помощью раствора TrypLE (gibco), предварительно промывая их 2 раза DPBS (gibco), не содержащим ионов кальция и магния. Затем клетки высаживали в лунки разборных 96-луночных планшетов,

предварительно покрытых полилизином (Sigma), в концентрациях 20 000 клеток на лунку для линии CT26, 7 000 клеток на лунку для линии 4T1 и 25 000 клеток – для линии SC-1. Для подсчета клеток использовали автоматический счетчик клеток EVE. Через 48 ч (когда клетки достигали 80 % конфлюэнтности) в части лунок культуральную среду заменяли на раствор НЧ в DPBS (с ионами кальция и магния, gibco) объемом 150 мкл. Конечная концентрация НЧ в лунках составляла 10 мг/мл (по железу). В ходе экспериментов клетки с НЧ помещали в генератор высокочастотного переменного магнитного поля (ПМП) TORUltra HT (NanoMaterials, Тамбов, Россия) и в течение 15 мин воздействовали полем с частотой f = 261 кГц, меняя его магнитуду (В = 10-25 мТл) для поддержания требуемой температуры нагрева. В качестве контролей использовали клетки, инкубировавшиеся с аналогичным раствором НЧ в инкубаторе в течение 15 мин, а также клетки, культивировавшиеся в ростовой среде или DPBS в инкубаторе, либо в магнитном поле. Для детектирования температуры при проведении экспериментов по МГТ в режиме реального времени использовали тепловизор Seek Thermal. Все эксперименты проводили в 3-4 повторностях.

Влияние контролируемой МГТ, опосредованной НЧ феррита кобальта  $CoFe_2O_4$  в условиях приложения высокочастотного ПМП, при температуре 42-43 °C, 46-48 °C и 58-60 °C, на тип гибели клеток было исследовано методом прижизненного окрашивания. Для этого использовали флуоресцентные красители из коммерческого набора Apopxin Deep Red, DNA Nuclear Green DCS1 и CytoCalcein Violet 450 (Apoptosis/Necrosis Detection Kit, abcam). Apopxin Deep Red позволяет детектировать фосфатидилсерин (ФС), находящийся на наружном слое плазматической мембраны клеток. DNA Nuclear Green DCS1 окрашивает ядра клеток, проникая внутрь клеток, благодаря нарушению проницаемости их мембраны. СуtoCalcein Violet 450 окрашивает цитоплазму живых клеток.
Кроме того, был проведен анализ уровня продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках. С этой целью клетки, подвергшиеся контролируемой МГТ, окрашивали прижизненным красителем H2DCFDA (2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат, life technologies).

Таким образом, после проведения экспериментов по исследованию влияния МГТ на клетки последние промывали раствором HBSS с 2 мМ Lглутамином и 10 мМ Хепес (pH 7,4) и добавляли к ним буфер с перечисленными красителями из коммерческого набора или с 2 мкМ H2DCFDA. Клетки инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре в темноте в случае окрашивания Apoptosis/Necrosis Detection Kit и в течение 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в случае окрашивания H2DCFDA. Затем клетки 4 раза промывали раствором HBSS. Полученные образцы исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS («Life Technologies», объективы LPlanFl 10x/0,3; LPlanFl 20x/0,4).

## Исследование противоопухолевой активности ФК

Для создания опухолевой модели ампулу С замороженными опухолевыми клетками, хранящуюся в жидком азоте, размораживали за неделю до имплантации клеток мышам линии BALB/c. Клетки пассировали 2-3 раза в неделю по мере достижения ими 70-90 % конфлюэнтности. За один день до введения клеток животным их рассаживали, чтобы на момент инъекции животным клетки находились на стадии логарифмического роста. Кроме того, в тот же день животным выбривали бок, в который впоследствии вводили опухолевые клетки, с помощью электробритвы. В день имплантации клеток их дважды отмывали фосфатно-солевым буфером, не содержащим ионов кальция и магния (DPBS, pH 7.2-7.4, gibco), и диссоциировали с TrypLE. К полученной суспензии помощью раствора добавляли культуральную среду, тщательно ресуспендировали и считали концентрацию клеток, используя для этого автоматический счетчик клеток Eve. Далее клетки центрифугировали при 2000 оборотах в минуту в течение 5 мин, сливали супернатант, дважды промывали осажденные клетки фосфатно-солевым буфером, не содержащим ионов кальция и магния, чтобы убрать остатки сыворотки во избежание развития иммунного ответа организма на чужеродный белок и возможного отторжения опухолевых клеток. Далее к клеткам добавляли холодный (4 °C) DPBS с ионами кальция и магния (gibco) так, чтобы в итоге добиться необходимой концентрации клеток (2,6 × 10<sup>6</sup> клеток в 50 мкл раствора для линии СТ26 и  $1 \times 10^6$  клеток для линии 4T1), и тщательно ресуспендировали. Все эксперименты на животных были одобрены биоэтическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова (протокол № 25/2017, 26/2017). Самки мышей породы BALB/с в возрасте от шести до восьми недель были получены из Андреевского центра животных (Андреевка, Россия). Для экспериментов использовали животных в возрасте от семи до девяти недель и весом 20-22 г [399]. С помощью инсулинового шприца 30g мышам подкожно вводили 50 мкл полученной суспензии опухолевых клеток в область, находящуюся на расстоянии 0,7-1 см латеральнее срединной линии (линии позвоночника) и 2,5-3,5 см краниально от основания хвоста животного. Через 7 дней после имплантации клеток измеряли размеры опухолей (ширину (а) и длину (b)) с помощью электронного штангенциркуля и считали площадь опухолей по формуле  $S = a \times b$ . Животных разделяли по экспериментальным группам так, чтобы средняя площадь опухолей в каждой группе была одинаковой. Были исследованы следующие группы:

1) группа DPBS – животные, которым на 8-ой день после введения клеток внутриопухолево вводили 100 мкл DPBS (контроль 1);

2) группа MNPs – мыши, которым внутриопухолево вводили 100 мкл раствора НЧ феррита кобальта в DPBS с концентрацией 60 мг/мл без последующего воздействия высокочастотным ПМП (контроль 2);

3) группа MNPs+AMF – животные, которым внутриопухолево вводили 100 мкл раствора ФК в DPBS с концентрацией 60 мг/мл с последующим помещением животных в генератор высокочастотного ПМП для обеспечения локальной контролируемой гипертермии. Данную терапию проводили в течение 1 (для опухолевой модели СТ26) и 3-х циклов (по 1 циклу по 30 мин в день в течение 3 дней для модели опухоли 4T1) нагрева при трех различных температурных режимах – 42-43 °C, 46-48 °C и 58-60 °C.

При подготовке животного с опухолью к проведению терапии мышь наркотизировали путем внутрибрюшинного введения раствора золетила (50 мг/кг) с ксилазином (5 мг/кг). После того, как животное засыпало, с помощью инсулинового шприца 30g обкалывали опухоль раствором НЧ следующим образом: порядка 10-20 мкл в центр опухоли и по 20 мкл по периферии, чтобы добиться равномерного распределения феррита кобальта по всему объему опухоли. Затем мышь укладывали в специальный не греющийся держатель и помещали в генератор высокочастотного переменного магнитного поля TOR UltraHT (NanoMaterials, Тамбов, Россия). Для локального нагрева опухоли до максимальной для каждого режима температуры (43 °C, 50 °C и 60 °C, соответственно) выставляли параметры магнитного поля f = 261 кГц (частота) и B = 25 мТл (магнитуда), допустимые для биологического применения [400,401]. Впоследствии для поддержания средней температуры (42-43 °C, 46-48 °C и 58-60 °C) варьировали магнитуду магнитного поля в пределах 15-25 мТл.

Для оценки эффективности противоопухолевой терапии с помощью контролируемой МГТ при разных температурах нагрева исследовали динамику изменения объемов опухолей во всех экспериментальных группах и выживаемость животных. Объем опухоли рассчитывали по формуле  $V = a^2/2$ × b, где a – наименьший из двух ортогональных размеров. Высоту опухоли считали равной а/2. Пересчет на объем опухоли делали потому, что после контролируемой магнитной гипертермии наблюдали уплощение опухоли, что находило бы отражения не при расчете площади поверхности новообразования, но означало уменьшение опухолевой массы. Мышей с опухолью СТ26 выводили из экспериментов по мере достижения опухолью площади, превышающей 150 мм<sup>2</sup>. В случае с мышами, которым была имплантирована опухоль 4T1, животных выводили из экспериментов при обнаружении признаков ухудшения состояния здоровья, a именно: уменьшение веса животного, снижение подвижности, изменение дыхания, снижение актов груминга и др. Это было связано с тем, что даже при отсутствии первичного очага злокачественного новообразования часть животных начинала проявлять описанные выше признаки раньше, чем мыши из контрольных групп 1 и 2, поскольку отсутствие первичного очага опухоли не гарантировало отсутствие новых очагов злокачественного новообразования (метастазов). Измерения размеров опухолей и массы тела животных проводили каждые 3-4 дня.

В случае хирургического удаления опухолевого новообразования на 8ой день после инъекции клеток 4T1 или CT26 мышам породы BALB/с область с опухолью тщательно выбривали, животных анестезировали и делали эллиптический разрез вокруг опухоли с помощью скальпеля. Опухолевую массу удаляли путем осторожного отделения от подлежащих тканей. Впоследствии края раны были сшиты с помощью рассасывающегося шовного материала. Все манипуляции проводили в стерильных условиях.

Для изучения влияния МГТ на распространение метастазов у мышей с подкожно привитой опухолью использовали клетки линии 4T1-luc. Эти клетки стабильно экспрессируют белок люциферазы, что позволяет обнаружить их с помощью системы визуализации *in vivo* (IVIS). Животных исследовали до и через каждые 3-6 дней после проведения терапии. Для этого им вводили 150 мг/кг D-люциферина (Perkin Elmer), анестезировали 2 %-ым изофлураном и визуализировали с помощью IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Living Image 4.5.5 (Perkin Elmer).

## Заключение

Благодаря своим уникальным магнитным свойствам магнитные наночастицы нашли множество разных применений в области терапии и диагностики опухолевых заболеваний. Показана возможность их применения в качестве контрастных агентов для МРТ, средств доставки лекарств и лекарственных препаратов для магнитной гипертермии. Тем не менее нерешенной проблемой на пути к трансляции в практическое применение остается вопрос исследования взаимосвязи между морфологией наночастицы и ее составом, физико-химическими свойствами и взаимодействием с живыми системами. В результате выполненных автором исследований были созданы новые и адаптированы существующие химические методики синтеза магнитных наночастиц с заданными формой, размером и составом и исследованы их физико-химические свойства. На основании полученных определяющие данных выявлены закономерности, зависимость эффективности магнитных наночастиц в тех или иных биомедицинских приложениях от их химического состава и морфологических параметров. В диагностическая экспериментах in vivo показана терапевтическая и эффективность магнитных наночастиц с оптимальными свойствами. выявленными комплексом физико-химических методов анализа. Проведенное исследование показывает, что морфология и состав магнитных наночастиц являются ключевыми параметрами, определяющими их физико-химические свойства и потенциал в биомедицине, а возможность контролировать данные параметры с высокой точностью открывает перспективы для получения новых, более эффективных диагностических терапевтических И лекарственных препаратов.

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

 Показано, что такие параметры как размер, форма, состав и связанные с ними физико-химические характеристики магнитных наночастиц являются ключевыми при оценке потенциала биомедицинского применения.  Использование высококипящих органических растворителей (бензилового спирта, 1-октадецена, дибензилового эфира) и ПАВ (олеиновой кислоты, олеиламина, циклических ароматических (бензойная и 1-инданкарбоновая)

и алифатических (в ряду циклопропанкарбоновая – циклогексанкарбоновая) карбоновых кислот), и варьирование концентраций прекурсоров, а также режима нагрева реакционной смеси в диапазоне 10-20 °С дает возможность получать магнитные наночастицы сферической, кубической, и стрежневой формы, а также наночастицы кластерного типа с размерами 6-40 нм.

- 3) Намагниченность насыщения кубических наночастиц оксидов железа возрастает монотонно в диапазоне размеров 20–40 нм до значения 74 Ам<sup>2</sup>кг<sup>-1</sup>, после чего выходит на плато. Напротив, зависимость динамических магнитных свойств наночастиц – Т2 релаксивности, от размера ядра имеет вид функции с экстремумом (r<sub>2</sub> = 367 мМ<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>), что согласуется с ранее предсказанными теоретическими зависимостями. Измерение тепловыделительной способности показало, что из всех исследованных образцов наночастицы феррита кобальта сферической формы с размером 9 нм обладают максимальным значением равным 1.78 ± 0.09 нГн·м<sup>2</sup>·кг<sup>-1</sup>.
- 4) Форма и намагниченность насыщения магнитных наночастиц не влияет на возможность получения стабильных водных коллоидных растворов с монодисперсным распределением наночастиц по размерам биосовместимых полимеров при использовании полимерных покрытий, содержащих полиэтиленгликоль. Основным параметром, ограничивающим возможность получения стабильных водных коллоидных растворов, является значение коэрцитивной силы. Получение стабильных водных магнитных наночастиц всех коллоидных растворов форм, кроме стержневидной, имеющих значения коэрцитивной силы, превышающие 10 кА•м<sup>-1</sup> не представляется возможным.

- 5) Не обнаружено достоверных различий в цитотоксическом эффекте между наночастицами кубической, кластерной и стержневидной морфологии вплоть до концентраций 200 мкг/мл.
- 6) Исследование контрастирования опухолей методом МРТ на модели опухоли карциномы толстой кишки СТ26 с использованием МНЧ показало, что МНЧ сферической, кубической и кластерной формы достоверно визуализируются в опухолевом очаге в более чем 70% случаев, тогда как стержневидные МНЧ накапливаются только в 30% случаев.
- 7) Показано, что использование СА, модифицированного ПЭГ в качестве покрытия магнитных наночастиц сохраняет способность СА связывать амфифильные лекарственные препараты, несущие первичную доксорубицин фотосенсибилизатор аминогруппу, И такие как бактериохлоринового ряда. Противоопухолевая терапия животных, несущих модель аденокарциномы молочной железы 4Т1 с использованием НЧ-СА@Докс-ПЭГ позволяет увеличить медиану выживаемости животных на 50% с 25 до 39 дней. Использование НЧ-СА@ФС4 в качестве тераностического средства позволяет определять время максимального накопления фотосенсибилизатора в опухоли методом МРТ, которое составляет 30 минут -1 час, при этом проведение ФДТ в указанное время приводит к редуцированию опухоли СТ26 в 100% случаев.
- 8) НЧ феррита кобальта сферической формы диаметром 12±4 нм обладают высокой тепловыделительной способностью в переменном магнитном поле и позволяют регулировать температуру нагрева биологических образцов с точностью 1-2 °C. Контролируемый локальный нагрев опухолевой ткани до 42-23 °C приводит к гибели клеток карциномы толстого кишечника СТ26 и полному излечению животных с привитыми опухолями СТ26, но неэффективен при терапии аденокарциномы молочной железы 4T1. Контролируемый нагрев до 46-48 °C приводит к излечению 25% мышей с привитыми опухолями 4T1 и снижает частоту метастазирования из первичного очага опухоли.

## Список сокращений

- МНЧ- магнитные наночастицы
- МРТ- магнитно-резонансная томография
- SAR specific adsorbtion rate
- ПАВ поверхностно активное вещество
- ГЛБ гидрофильно-липофильный баланс
- SDS додецилсульфат натрия
- СТАС цетилтриметиламмоний хлорид
- СТАВ цетилтриметиламмоний бромид
- Na(AOT) сульфосукцинат натрия
- Triton X-100 полиоксиэтилен октилфениловый эфир
- ПЭИ полиэтиленимин
- ПЭфИ полиэфиримид
- СПМ- суперпарамагнитные наночастицы
- ДЭГ -диэтиленгликоль
- ТЭГ триэтиленгликоль
- ОК -олеиновая кислота
- ОА- олеиламин
- ПВП поливинилпирролидон
- ПЛГА поли(молочная-со-гликолевая кислота)
- ПЭГ полиэтиленгликоль
- ПВС поливиниловый спирт
- ПВСП поли(винилспиртофосфат)
- ПЭМ просвечивающая электронная микроскопия
- ЧСА- человеческий сывороточный альбумин
- БСА- бычий сывороточный альбумин
- СА сывороточный альбумин
- M<sub>s</sub>- намагниченность насышения

- H<sub>c</sub> коэрцитивная сила
- НЧсф- сферические наночастицы
- НЧкуб- кубические наночастицы
- НЧст -стержневидные наночастицы
- НЧкл кластерные наночастицы
- РФА ренгенофазовый анализ

## Список литературы

- Wang Y.X.J. Current status of superparamagnetic iron oxide contrast agents for liver magnetic resonance imaging // World J. Gastroenterol. 2015. Vol. 21, № 47. P. 13400–13402.
- Kim E.H. et al. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent // J. Magn. Magn. Mater. 2005. Vol. 289. P. 328–330.
- Nemati Z. et al. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects // J. Phys. Chem. C. 2016. Vol. 120, № 15. P. 8370–8379.
- Espinosa A. et al. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment // ACS Nano. 2016. Vol. 10, № 2. P. 2436– 2446.
- Molday R.S., Mackenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells // J. Immunol. Methods. 1982. Vol. 52, № 3. P. 353–367.
- 6. Thomas J.A. et al. Immunomagnetic separation of microorganisms with iron oxide nanoparticles // Chemosensors. 2020. Vol. 8, № 1.
- Efremova M.V. et al. In Situ Observation of Chymotrypsin Catalytic Activity Change Actuated by Nonheating Low-Frequency Magnetic Field // ACS Nano. 2018. Vol. 12, № 4. P. 3190–3199.
- Klyachko N.L. et al. Changing the enzyme reaction rate in magnetic nanosuspensions by a non-heating magnetic field // Angew. Chemie Int. Ed. 2012. Vol. 51, № 48. P. 12016–12019.
- Master A.M. et al. Remote actuation of magnetic nanoparticles for cancer cell selective treatment through cytoskeletal disruption // Sci. Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 1–13.
- Li Q. et al. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe3O4 nanoparticles // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–4.
- 11. Krishnan K.M. et al. Nanomagnetism and spin electronics: Materials,

microstructure and novel properties // J. Mater. Sci. 2006. Vol. 41, № 3. P. 793–815.

- T J W Mullinitle. Crystallization. 4th ed. Butterworth-Heinemann, 2001. 600 p.
- 13. Wu Z., Yang S., Wu W. Shape control of inorganic nanoparticles from solution // Nanoscale. 2016. Vol. 8, № 3. P. 1237–1259.
- Hyeon T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles // Chem. Commun. 2003. Vol. 3, № 8. P. 927–934.
- Boutonnet M. et al. The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions // Colloids and Surfaces. 1982. Vol. 5, № 3. P. 209– 225.
- Eastoe J., Hollamby M.J., Hudson L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles // Adv. Colloid Interface Sci. 2006. Vol. 128–130, № 2006. P. 5–15.
- 17. Holmberg K. Surfactant-templated nanomaterials synthesis // J. Colloid Interface Sci. 2004. Vol. 274, № 2. P. 355–364.
- Pileni M.P. Nanosized particles made in colloidal assemblies // Langmuir. 1997. Vol. 13, № 13. P. 3266–3276.
- 19. Lemke K., Koetz J. Polycation-capped CdS quantum dots synthesized in reverse microemulsions // J. Nanomater. 2012. Vol. 2012.
- López-Quintela M.A. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: Formation mechanisms and growth control // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2003. Vol. 8, № 2. P. 137–144.
- Sanchez-Dominguez M., Aubery C., Solans C. New Trends on the Synthesis of Inorganic Nanoparticles Using Microemulsions as Confined Reaction Media // Smart Nanoparticles Technol. 2012. P. 195–220.
- 22. Housaindokht M.R., Nakhaei Pour A. Study the effect of HLB of surfactant on particle size distribution of hematite nanoparticles prepared via the reverse microemulsion // Solid State Sci. 2012. Vol. 14, № 5. P. 622–625.
- 23. Pileni M.P. The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals // Nat. Mater. 2003. Vol. 2, № 3. P. 145–150.
- 24. Lakshmanan R. et al. Microemulsion prepared magnetic nanoparticles for

phosphate removal: Time efficient studies // J. Environ. Chem. Eng. 2014. Vol. 2, № 1. P. 185–189.

- 25. Caponetti E. et al. Synthesis, size control, and passivation of CdS nanoparticles in water/AOT/n-heptane microemulsions // Mater. Sci. Eng. C. 2003. Vol. 23, № 4. P. 531–539.
- 26. Lee Y. et al. Large-scale synthesis of uniform and crystalline magnetite nanoparticles using reverse micelles as nanoreactors under reflux conditions // Adv. Funct. Mater. 2005. Vol. 15, № 3. P. 503–509.
- Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media // IEEE Trans. Magn. 1981. Vol. 17, № 2. P. 1247–1248.
- Nawaz M. et al. Magnetic and pH-responsive magnetic nanocarriers // Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications. 2019. 37–85 p.
- Gupta A.K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications // Biomaterials. 2005. Vol. 26, № 18. P. 3995–4021.
- Wu W., Jiang C.Z., Roy V.A.L. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications // Nanoscale. 2016. Vol. 8, № 47. P. 19421–19474.
- Karkan S.F. et al. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment : a review // Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol. 2016. Vol. 1401, № March. P. 1–5.
- Lu A.H., Salabas E.L., Schüth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application // Angew. Chemie - Int. Ed. 2007. Vol. 46, № 8. P. 1222–1244.
- Bee A., Massart R., Neveu S. Synthesis of very fine maghemite particles // J. Magn. Magn. Mater. 1995. Vol. 149. P. 6–9.
- Zhao D. et al. Inductive heat property of Fe3O4/polymer composite nanoparticles in an ac magnetic field for localized hyperthermia // Biomed. Mater. 2006. Vol. 1. P. 198–201.
- Vasanthakumari S.V.R., Tsuzuki T., Rangarajan M. Investigations of suspension stability of iron oxide nanoparticles using time-resolved UV – visible spectroscopy // J. Nanoparticle Res. 2016. Vol. 18. P. 272.

- Annapoorani M.K.S.S. Magnetic hyperthermia studies on water-soluble polyacrylic acid-coated cobalt ferrite nanoparticles // J. Nanoparticle Res. 2014. Vol. 16. P. 2773.
- 37. Yoo S.S. et al. Fabrication and in vitro characterization of gadolinium-based nanoclusters for simultaneous drug delivery and radiation enhancement // Nanotechnology. Vol. 27, № 38. P. 1–14.
- Park J. et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals // Nat. Mater. 2004. Vol. 3, № 12. P. 891–895.
- Tanwar S., V.P.S A., Surinder P.S. Magnetic Field Dependence of Blocking Temperature in Oleic Acid Functionalized Iron Oxide Nanoparticles // J. Supercond. Nov. Magn. 2012. Vol. 25. P. 2041–2045.
- 40. Hyeon T. et al. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process // J. Am. Chem. Soc. 2001. Vol. 123, № 51. P. 12798–12801.
- 41. Sun S., Zeng H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles // J. Am. Chem. Soc. 2002. Vol. 124, № 28. P. 8204–8205.
- Dinegar R.H., LaMer V.K. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols // J. Am. Chem. Soc. 1950. Vol. 72, № 11. P. 4847–4854.
- Reiss H. The Growth of Uniform Colloidal Dispersions // J. Chem. Phys. 1951. Vol. 19. P. 482–487.
- 44. Li Z., Sun Q., Gao M. Preparation of Water-Soluble Magnetite Nanocrystals from Hydrated Ferric Salts in 2-Pyrrolidone: Mechanism Leading to Fe3O4 // Angew. Chemie. Vol. 44, № 1. P. 123–126.
- 45. Hu F. et al. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer // Adv. Mater. 2006. Vol. 18, № 19. P. 2553–2556.
- 46. Yang H. et al. Water-soluble superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for magnetic resonance imaging // Biomaterials. 2010. Vol. 31, № 13. P. 3667–3673.
- 47. Pinna N. et al. Magnetite Nanocrystals: Nonaqueous Synthesis, Characterization, and Solubility // Chem. Mater. 2005. Vol. 17, № 11. P. 3044–3049.

- 48. Yu W.W. et al. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. // Chem. Commun. (Camb). 2004. № 20. P. 2306–2307.
- 49. Nawaz M. et al. F–Bi4TaO8Cl flower-like hierarchical structures: controlled preparation, formation mechanism and visible photocatalytic hydrogen production // RSC Adv. 2016. Vol. 7. P. 121–127.
- Nawaz M. Morphology-controlled preparation of Bi2S3 -ZnS chloroplastlike structures, formation mechanism and photocatalytic activity for hydrogen production // J. Photochem. Photobiol. A Chem. 2017. Vol. 332. P. 326–330.
- 51. Li J., Shi X., Shen M. Hydrothermal Synthesis and Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for MR Imaging Applications // Part. Part. Syst. Charact. 2014. Vol. 31, № 12. P. 1223–1237.
- 52. Li J. et al. Polyethyleneimine-mediated synthesis of folic acid-targeted iron oxide nanoparticles for in vivo tumor MR imaging // Biomaterials. 2013. Vol. 34, № 33. P. 8382–8392.
- 53. Zahraei M. et al. Versatile theranostics agents designed by coating ferrite nanoparticles with biocompatible polymers // Nanotechnology. 2016. Vol. 27, № 25. P. 255702.
- 54. Jiao Y. et al. Tumor-Targeting Multifunctional Rattle-Type Theranostic Nanoparticles for MRI/NIRF Bimodal Imaging and Delivery of Hydrophobic Drugs // Small. 2014. Vol. 11, № 16. P. 1962–1974.
- 55. Sun J. et al. Targeted fluorescent magnetic nanoparticles for imaging of human breast cancer // Int. J. Clin. Exp. Med. 2014. Vol. 7, № 12. P. 4747– 4758.
- 56. Huang R. et al. Redox-Sensitive Polymer/SPIO Nanocomplexes for Efficient Magnetofection and MR Imaging of Human Cancer Cells // Langmuir. 2015. Vol. 31, № 23. P. 6523–6531.
- Luo Y. et al. Facile synthesis and functionalization of manganese oxide nanoparticles for targeted T 1 -weighted tumor MR imaging // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2015. Vol. 136. P. 506–513.
- 58. Khaleel A. et al. The effect of metal ion dopants (V3+, Cr3+, Fe3+, Mn2+, Ce3+) and their concentration on the morphology and the texture of doped γalumina // Microporous Mesoporous Mater. 2013. Vol. 168. P. 7–14.

- 59. Khaleel A., Nawaz M. The effect of composition and gel treatment conditions on the textural properties, reducibility, and catalytic activity of sol-gel-prepared Fe(III)–Cr(III) bulk mixed oxides // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2016. Vol. 488. P. 52–57.
- Salunkhe A.B., Khot V.M., Pawar S.H. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review // Curr. Top. Med. Chem. 2014. Vol. 14, № 5. P. 572–594.
- 61. Mornet S. et al. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy // J. Mater. Chem. 2004. Vol. 14. P. 2161–2175.
- Laurent S. et al. Magnetic fluid hyperthermia : Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles // Adv. Colloid Interface Sci. Elsevier B.V., 2011. Vol. 166, № 1–2. P. 8–23.
- 63. Arteaga-Cardona F. et al. Cell viability and MRI performance of highly efficient polyol-coated magnetic nanoparticles // J. Nanoparticle Res. 2016. Vol. 18, № 11. P. 345.
- 64. Wan J. et al. Stable and Biocompatible Colloidal Dispersions of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Minimum Aggregation for Biomedical Applications // J. Phys. Chem. C. 2016. Vol. 120, № 41. P. 23799–23806.
- 65. Wan J., Cai W., Liu E. Monodisperse water-soluble magnetite nanoparticles prepared by polyol process for high-performance magnetic resonance imaging // Chem. Commun. 2007. № 47. P. 5004–5006.
- Abu Mukh-Qasem R., Gedanken A. Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe3O4 nanoparticles // J. Colloid Interface Sci. 2005. Vol. 284. P. 489–494.
- 67. González-Carreño T. et al. Preparation of uniform γ-Fe2O3 particles with nanometer size by spray pyrolysis // Mater. Lett. 1993. Vol. 18. P. 151–155.
- Lawrence M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems // Adv. Drug Deliv. Rev. 2000. Vol. 45, № 1. P. 89–121.
- Deng Y. et al. Hydrothermal synthesis and characterization of nanocrystalline PZT powders // Mater. Lett. 2003. Vol. 57, № 11. P. 1675– 1678.
- 70. Sun S. et al. Monodisperse MFe 2 O 4 (M) Fe, Co, Mn) Nanoparticles // J.

Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 1. P. 126–132.

- 71. Yang H. et al. Synthesis and magnetic properties of monodisperse magnetite nanocubes // J. Appl. Phys. 2013. Vol. 526, № 2008. P. 28–31.
- Stanicki D. et al. Synthesis and processing of magnetic nanoparticles // Curr. Opin. Chem. Eng. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 8. P. 7–14.
- Kim D. et al. Synthesis of Uniform Ferrimagnetic Magnetite Nanocubes // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131. P. 454–455.
- Gao G. et al. Shape-Controlled Synthesis and Magnetic Properties of Monodisperse Fe3O4 Nanocubes // Cryst. Growth Des. 2010. Vol. 10, № 7.
   P. 2888–2894.
- 75. Shavel B.A. et al. Synthesis and Characterization of Iron / Iron Oxide Core / Shell Nanocubes // Adv. Funct. Mater. 2007. Vol. 17, № 18. P. 3870–3876.
- Sun H. et al. Solvothermal synthesis of tunable electroactive magnetite nanorods by controlling the side reaction // J. Phys. Chem. C. 2012. Vol. 116, № 9. P. 5476–5481.
- 77. Milosevic I. et al. Facile Microwave Process in Water for the Fabrication of Magnetic Nanorods // J. Phys. Chem. C. 2011. Vol. 115, № 39. P. 18999– 19004.
- Mohapatra J. et al. Iron oxide nanorods as high-performance magnetic resonance imaging contrast agents // Nanoscale. 2015. Vol. 7, № 20. P. 9174–9184.
- 79. Feng L. et al. Polymer-controlled synthesis of Fe3O4 single-crystal nanorods
  // J. Colloid Interface Sci. 2004. Vol. 278, № 2. P. 372–375.
- Li L. et al. Synthesis of Magnetite Nanooctahedra and Their Magnetic Field-Induced Two- / Three-Dimensional Superstructure // Chem. Mater. 2010. Vol. 22, № 10. P. 3183–3191.
- Lenart V.M. et al. Synthesis of Magnetite Nanoparticles of Different Size and Shape by Interplay of Two Different Surfactants // Brazilian J. Phys. 2019. Vol. 49. P. 829–835.
- 82. Zhao Z. et al. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T2 contrast agents for magnetic resonance imaging // Nat. Commun. 2013. Vol. 4, № 1. P. 1–7.

- Zhang L., Dou Y.H., Gu H.C. Sterically induced shape control of magnetite nanoparticles // J. Cryst. Growth. 2006. Vol. 296, № 2. P. 221–226.
- 84. Cozzoli P.D. et al. Colloidal Synthesis and Characterization of Tetrapod-Shaped Magnetic Nanocrystals // Nano Lett. 2006. Vol. 6, № 9.
- 85. Lefebure S. et al. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils // J. Mater. Res. 1998. Vol. 13. P. 2975–2981.
- Yu J.S. et al. Intratumoral T cell subset ratios and Fas ligand expression on brain tumor endothelium // J. Neurooncol. 2003. Vol. 64. P. 55–61.
- Chen M. et al. Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications // J. Appl. Phys. 2003. Vol. 93. P. 7551–7553.
- 88. Lin J. et al. Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-Assembly // J. Solid State Chem. 2001. Vol. 159, № 1. P. 26–31.
- 89. Zhao X., Milton Harris J. Novel Degradable Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels for Controlled Release of Protein // J. Pharm. Sci. 1998. Vol. 87, № 11. P. 1450–1458.
- 90. Ruiz J.M., Benoit J.P. In vivo peptide release from poly(dl-lactic acid-co-glycolic acid) copolymer 5050 microspheres // J. Control. Release. 1991.
   Vol. 16, № 1–2. P. 177–185.
- 91. Schwich H.G., Heide K. Immunochemistry and Immunology of Collagen and Gelatin. 1969. № 33. P. 111–125.
- 92. Massia S.P., Stark J., Letbetter D.S. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading // Biomaterials. 2000. Vol. 21, № 22. P. 2253–2261.
- 93. Miller E.S., Peppas N.A., Winslow D.N. Morphological changes of ethylene/vinyl acetate-based controlled delivery systems during release of water-soluble solutes // J. Memb. Sci. 1983. Vol. 14, № 1. P. 79–92.
- 94. Hines D.J., Kaplan D.L. Poly(lactic-co-glycolic) Acid-Controlled-Release Systems: Experimental and Modeling Insights // Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2013. Vol. 30, № 3. P. 257–276.
- 95. Li J.K., Wang N., Wu X.S. A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery // J. Pharm. Sci. 1997. Vol. 86, № 8. P. 891–895.

- 96. Akiyoshi K. et al. Self-assembly of hydrophobized polysaccharide // Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 1995. Vol. 71, № 1. P. 15–19.
- 97. Jeong Y. Il et al. Self-assembling nanospheres of hydrophobized pullulans in water // Drug Dev. Ind. Pharm. 1999. Vol. 25, № 8. P. 917–927.
- Denizot B. et al. Phosphorylcholine coating of iron oxide nanoparticles // J. Colloid Interface Sci. 1999. Vol. 209, № 1. P. 66–71.
- 99. Teng J., Li Z., Pu J. Preparation and properties of infrared heat-sensitive polymer nanoparticles // Lect. Notes Electr. Eng. 2016. Vol. 369, № 12. P. 883–890.
- 100. Zaitsev V.S. et al. Physical and chemical properties of magnetite and magnetite-polymer nanoparticles and their colloidal dispersions // J. Colloid Interface Sci. 1999. Vol. 212, № 1. P. 49–57.
- 101. Zhu N. et al. Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles // Nanomaterials. 2018. Vol. 8, № 10. P. 1–27.
- 102. Ngaboni Okassa L. et al. Development and characterization of sub-micron poly(D,L-lactide-co- glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles // Int. J. Pharm. 2005. Vol. 302, № 1–2. P. 187–196.
- 103. Zhang Y., Kohler N., Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake // Biomaterials. 2002. Vol. 23, № 7. P. 1553–1561.
- Lacava L.M. et al. Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice // Biophys. J. 2001. Vol. 80, № 5. P. 2483–2486.
- 105. Jung C.W. Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: Ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil // Magn. Reson. Imaging. 1995. Vol. 13, № 5. P. 675–691.
- 106. Carmen Bautista M. et al. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation // J. Magn. Magn. Mater. 2005. Vol. 293, № 1. P. 20–27.
- 107. Holthoff H. et al. Measurement of absolute coagulation rate constants for colloidal particles: Comparison of single and multiparticle light scattering techniques // J. Colloid Interface Sci. 1997. Vol. 192, № 2. P. 463–470.
- 108. Fournier C. et al. Coating Polystyrene Particles by Adsorption of

Hydrophobically Modified Dextran // Langmuir. 1995. Vol. 11, № 7. P. 2344–2347.

- 109. Paul K.G. et al. Synthesis of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides Using Reduced Polysaccharides // Bioconjug. Chem. 2004. Vol. 15, № 2. P. 394–401.
- 110. Tiefenauer L.X. et al. In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI // Magn. Reson. Imaging. 1996. Vol. 14, № 4. P. 391–402.
- McCarthy J.R., Weissleder R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. Vol. 60, № 11.
   P. 1241–1251.
- 112. Yue-Jian C. et al. Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent // Drug Dev. Ind. Pharm. 2010. Vol. 36, № 10. P. 1235–1244.
- 113. Park J.Y. et al. Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications. // Nanotechnology. 2008. Vol. 19. P. 365603.
- 114. Kumagai M. et al. Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2007. Vol. 56. P. 174–181.
- 115. Sairam M. et al. Poly(vinyl alcohol)-iron oxide nanocomposite membranes for pervaporation dehydration of isopropanol, 1,4-dioxane and tetrahydrofuran // J. Memb. Sci. 2006. Vol. 283, № 1–2. P. 65–73.
- 116. Neuberger T. et al. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system // J. Magn. Magn. Mater. 2005. Vol. 293, № 1. P. 483–496.
- 117. Chastellain M., Petri A., Hofmann H. Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles // J. Colloid Interface Sci. 2004. Vol. 278, № 2. P. 353–360.
- 118. Osada Y., Gong J.P. Soft and wet materials: Polymer gels // Adv. Mater.
   1998. Vol. 10, № 11. P. 827–837.
- 119. Nishio Y. et al. Preparation and magnetometric characterization of iron

oxide-containing alginate/poly(vinyl alcohol) networks // Polymer (Guildf). 2004. Vol. 45, № 21. P. 7129–7136.

- 120. Llanes F., Ryan D.H., Marchessault R.H. Magnetic nanostructured composites using alginates of different M/G ratios as polymeric matrix // Int. J. Biol. Macromol. 2000. Vol. 27, № 1. P. 35–40.
- 121. Kroll E., Winnik F.M., Ziolo R.F. In situ preparation of nanocrystalline γ-Fe2O3 in iron(II) cross-linked alginate gels // Chem. Mater. 1996. Vol. 8, № 8. P. 1594–1596.
- Ma H. li et al. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate // Int. J. Pharm. 2007. Vol. 333, № 1–2. P. 177–186.
- 123. Morales M.A. et al. In situ synthesis and magnetic studies of iron oxide nanoparticles in calcium-alginate matrix for biomedical applications // Mater. Sci. Eng. C. 2008. Vol. 28, № 2. P. 253–257.
- 124. Frank L.A. et al. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications // React. Funct. Polym. 2020. Vol. 147. P. 104459.
- 125. Bae K.H. et al. Chitosan oligosaccharide-stabilized ferrimagnetic iron oxide nanocubes for magnetically modulated cancer hyperthermia // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 6. P. 5266–5273.
- 126. Lee H.S. et al. Synthesis of SPIO-chitosan microspheres for MRI-detectable embolotherapy // J. Magn. Magn. Mater. 2005. Vol. 293, № 1. P. 102–105.
- 127. Laurent S. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications // Chem. Rev. 2008. Vol. 108, № 6. P. 2064–2110.
- 128. Reimer P., Wittenberg J., Lee S. Receptor imaging: application to MR imaging of liver cancer // Radiology. 1990. Vol. 177, № 3. P. 729–734.
- 129. Reimer P. et al. Receptor-directed contrast agents for MR imaging: preclinical evaluation with affinity assays. // Radiology. 1992. Vol. 182, № 2. P. 565–569.
- 130. Arbab A.S. et al. Characterization of Biophysical and Metabolic Properties of Cells Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Transfection Agent for Cellular MR Imaging // Radiology. 2003. Vol. 229, № 3. P. 838–846.

- 131. Sun H. et al. Capture and release of genomic DNA by PEI modified Fe3O4/Au nanoparticles // Mater. Sci. Eng. C. 2010. Vol. 30, № 2. P. 311– 315.
- 132. Kapilov-Buchman Y. et al. Unique surface modification of silica nanoparticles with polyethylenimine (PEI) for siRNA delivery using cerium cation coordination chemistry // Bioconjug. Chem. 2015. Vol. 26, № 5. P. 880–889.
- 133. Ulasov A. V. et al. Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy // Mol. Ther. 2011. Vol. 19, № 1. P. 103–112.
- 134. Okassa L.N. et al. Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(d,l-lactide-co-glycolide) sub-micron particles // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2007. Vol. 67, № 1. P. 31–38.
- 135. Ibarra J. et al. Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles // Mater. Res. Express. 2015. Vol. 2, № 9. P. 95010.
- 136. Hernández-Hernández A.A. et al. Iron oxide nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in diagnosis and treatment of cancer // Chem. Pap. 2020. Vol. 74, № 11. P. 3809–3824.
- Elzoghby A.O., Hemasa A.L., Freag M.S. Hybrid protein-inorganic nanoparticles: From tumor-targeted drug delivery to cancer imaging // J. Control. Release. 2016. Vol. 243. P. 303–322.
- 138. Chia Hua Lin C.Y.W. Using Glucose-bound Fe3O4 Magnetic Nanoparticles as Photothermal Agents for Targeted Hyperthermia of Cancer Cells // J. Nanomed. Nanotechnol. 2015. Vol. 06, № 01. P. 1–7.
- 139. Moniri M. et al. In vitro molecular study of wound healing using biosynthesized bacteria nanocellulose/ silver nanocomposite assisted by bioinformatics databases // Int. J. Nanomedicine. 2018. Vol. 13. P. 5097– 5112.
- 140. Sanganeria P. et al. Cellular internalization and detailed toxicity analysis of protein-immobilized iron oxide nanoparticles // J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. 2015. Vol. 103, № 1. P. 125–134.
- 141. Moore A. et al. Measuring transferrin receptor gene expression by NMR imaging // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1998. Vol. 1402, № 3. P. 239–249.

- 142. Berry C.C. et al. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture // Int. J. Pharm. 2004. Vol. 269, № 1. P. 211–225.
- 143. Gupta A.K. et al. Receptor-Mediated Targeting of Magnetic Nanoparticles Using Insulin as a Surface Ligand to Prevent Endocytosis // IEEE Trans. Nanobioscience. 2003. Vol. 2, № 4. P. 255–261.
- 144. Baker M.E. Albumin's role in steroid hormone action and the origins of vertebrates : is albumin an essential protein ? // FEBS Lett. 1998. Vol. 439, № 1–2. P. 9–12.
- 145. Hou C. han et al. The fabrication and characterization of dicalcium phosphate dihydrate-modified magnetic nanoparticles and their performance in hyperthermia processes in vitro // Biomaterials. 2009. Vol. 30, № 27. P. 4700–4707.
- 146. Wang W. et al. Carboxyl modified magnetic nanoparticles coated open tubular column for capillary electrochromatographic separation of biomolecules // J. Chromatogr. A. 2015. Vol. 1411. P. 92–100.
- 147. Shariati S. et al. Fe3O4 magnetic nanoparticles modified with sodium dodecyl sulfate for removal of safranin O dye from aqueous solutions // Desalination. 2011. Vol. 270, № 1–3. P. 160–165.
- 148. Liu J. et al. Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups // Angew. Chemie Int. Ed. 2009. Vol. 48, № 32. P. 5875–5879.
- 149. Wagner S. et al. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: Preclinical in vivo characterization // Invest. Radiol. 2002. Vol. 37, № 4. P. 167–177.
- 150. van der Walt H., Chown L. Polysorbate Stabilised Fe3O4 and Fe3O4@Au Nanoparticle Synthesis and Characterisation // Mater. Today Proc. 2015. Vol. 2, № 7. P. 4081–4089.
- 151. Rose A.L., Waite T.D. Kinetics of hydrolysis and precipitation of ferric iron in seawater // Environ. Sci. Technol. 2003. Vol. 37, № 17. P. 3897–3903.
- 152. Orbeci C., Untea I., Kopsiaftis G. The influence of the inorganic species on oxidative degradation of 4-chlorophenol by photo-fenton type process // Rev. Chim. 2008. Vol. 59, № 9. P. 952–955.

- 153. Liu C., Huang P.M. Kinetics of phosphate adsorption on iron oxides formed under the influence of citrate // Can. J. Soil Sci. 2000. Vol. 80, № 3. P. 445– 454.
- 154. Sui Y. et al. Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2012. Vol. 93. P. 24–28.
- 155. Ruiz A. et al. Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine // J. Nanoparticle Res. 2014. Vol. 16, № 11.
- 156. Kim E. et al. Phosphocholine-Modified Magnetic Nanoparticles for Isolation of C-Reactive Protein from Human Serum // Sep. Sci. Technol. 2013. Vol. 48, № 17. P. 2600–2607.
- 157. Cousin F., Dubois E., Cabuil V. Tuning the interactions of a magnetic colloidal suspension // Phys. Rev. E. 2003. Vol. 68, № 2. P. 021405.
- 158. Cousin F. et al. Overview of the phase diagram of ionic magnetic colloidal dispersions // Brazilian J. Phys. 2001. Vol. 31, № 3. P. 350–355.
- 159. Dubois E. et al. Liquid-gas transitions in charged colloidal dispersions: small-angle neutron scattering coupled with phase diagrams of magnetic fluids // Langmuir. 2000. Vol. 16, № 13. P. 5617–5625.
- 160. Sahoo Y. et al. Alkyl Phosphonate / Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles : A Comparison with Fatty Acids // Langmuir. 2001. № 23. P. 7907–7911.
- 161. Portet D. et al. Comparative Biodistribution of Thin-Coated Iron Oxide Nanoparticles TCION : Effect of Different Bisphosphonate Coatings // Drug Dev. Res. 2001. Vol. 54, № 4. P. 173–181.
- 162. Mutin P.H., Guerrero G. Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules // J. Mater. Chem. 2005. Vol. 15, № 35–36. P. 3761–3768.
- 163. Mohapatra S., Pramanik N., Ghosh S.K. Synthesis and Characterization of Ultrafine Poly (vinylalcohol phosphate) Coated Magnetite Nanoparticles // J. Nanosci. Nanotechnology, 2006. Vol. 6, № 3. P. 823–829.
- 164. Turcheniuk K. et al. Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles // Nanoscale. 2013. Vol. 5, № 22. P. 10729.

- 165. Xu C. et al. Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 32. P. 9938–9939.
- 166. Amstad E. et al. Influence of electronegative substituents on the binding affinity of catechol-derived anchors to Fe 3O 4 nanoparticles // J. Phys. Chem. C. 2011. Vol. 115. P. 683–691.
- 167. Gillich T. et al. PEG-Stabilized Core–Shell Nanoparticles: Impact of Linear versus Dendritic Polymer Shell Architecture on Colloidal Properties and the Reversibility of Temperature-Induced Aggregation // ACS Nano. 2013. Vol. 7, № 1. P. 316–329.
- Soares P.I.P. et al. Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications // Appl. Surf. Sci. 2016. Vol. 383. P. 240–247.
- 169. Mahdavi M. et al. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications // Molecules. 2013. Vol. 18, № 7. P. 7533–7548.
- 170. Zhang L., He R., Gu H. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles // Appl. Surf. Sci. 2006. Vol. 253, № 5. P. 2611–2617.
- 171. Ogden S.G., Lewis D., Shapter J.G. Silane Functionalisation of Iron Oxide Nanoparticles // Proc. SPIE 7267, Smart Materials V. 2008. Vol. 7267, № 1. P. 72670A.
- 172. Abdollah S.M., Fereshteh F., Nazanin F. Synthesis and Modification of Iron Oxide Nanoparticles (Magnetite) for Biomedical Applications // Res. J. Biotechnol. 2017. Vol. 12, № 9. P. 87–95.
- Tadic M. et al. Iron oxide nanochains coated with silica : Synthesis , surface effects and magnetic properties // Appl. Surf. Sci. 2019. Vol. 476. P. 641–646.
- 174. Fadeev M. et al. Iron oxide @ gold nanoparticles: Synthesis, properties and potential use as anode materials for lithium-ion batteries // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2020. Vol. 603. P. 125178.
- 175. Warren C. Synthesis , Characterization , and Functionalization of Magnetic Iron Nanoparticles for Enhanced Biological Applications. Virginia Commonwealth University, 2013.

- 176. Guerrero-Martínez A., Pérez-Juste J., Liz-Marzán L.M. Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials // Adv. Mater. 2010. Vol. 22, № 11. P. 1182–1195.
- 177. Sun Y. et al. An improved way to prepare superparamagnetic magnetitesilica core-shell nanoparticles for possible biological application // J. Magn. Magn. Mater. 2005. Vol. 285. P. 65–70.
- Tumturk H., Sahin F., Turan E. Magnetic nanoparticles coated with different shells for biorecognition: high specific binding capacity // Analyst. 2014. Vol. 139. P. 1093–1100.
- Butterworth M.D. et al. Synthesis and Characterization of Polypyrrole-Magnetite-Silica Particles // J. Colloid Interface Sci. 1996. Vol. 183. P. 91– 99.
- Li B.D. et al. Functionalization Strategies for Protease Immobilization on Magnetic Nanoparticles // Adv. Funct. Mater. 2010. Vol. 20. P. 1767–1777.
- 181. Yamaura M. et al. Preparation and characterization of (3aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles // J. Magn. Magn. Mater. 2004. Vol. 279, № 2–3. P. 210–217.
- 182. Lin J. et al. Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-Assembly // J. Solid State Chem. 2001. Vol. 159. P. 26–31.
- 183. Zhao Y. et al. The vital function of Fe3O4@Au nanocomposites for hydrolase biosensor design and its application in detection of methyl parathion // Nanoscale. 2013. Vol. 5. P. 1121–1126.
- 184. Du J., Jing C. Preparation of Thiol Modified Fe3O 4 @Ag Magnetic SERS Probe for PAHs Detection and Identification // J. Phys. Chem. C. 2011. Vol. 115, № 36. P. 17829–17835.
- 185. Gao G. et al. Superparamagnetic Fe3O4 Ag hybrid nanocrystals as a potential contrast agent for CT imaging // CrystEngComm. 2012. Vol. 14. P. 7556–7559.
- 186. Tang D., Yuan R., Chai Y. Magnetic Core Shell Fe3O4@Ag Nanoparticles Coated Carbon Paste Interface for Studies of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Immunoassay // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. P. 11640–11646.
- 187. An Q. et al. Silver-coated magnetite-carbon core-shell microspheres as

substrate-enhanced SERS probes for detection of trace persistent organic pollutants // Nanoscale. 2012. Vol. 4. P. 5210–5216.

- 188. Ye Y. et al. Sea-urchin-like Fe3O4@C@Ag particles: an efficient SERS substrate for detection of organic pollutants // Nanoscale. 2013. Vol. 5. P. 5887–5895.
- 189. Liang H. et al. Multifunctional Fe3O4@C@Ag hybrid nanoparticles : Aqueous solution preparation, characterization and photocatalytic activity // Mater. Res. Bull. 2013. Vol. 48, № 7. P. 2415–2419.
- 190. Xia H. et al. Synthesis and characterization of Fe3O4@C@ Ag nanocomposites and their antibacterial performance // Appl. Surf. Sci. 2011. Vol. 257, № 22. P. 9397–9402.
- 191. Chen J. et al. Multifunctional Fe3O4@C@Ag hybrid nanoparticles as dual modal imaging probes and near-infrared light-responsive drug delivery platform // Biomaterials. 2013. Vol. 34, № 2. P. 571–581.
- 192. Faraji M., Yamini Y., Rezaee M. Magnetic Nanoparticles : Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications // J. Iran. Chem. Soc. 2010. Vol. 7, № 1. P. 1–37.
- 193. Kotoulas A. et al. Carbon-encapsulated cobalt nanoparticles : synthesis, properties, and magnetic particle hyperthermia efficiency // J. Nanoparticle Res. 2017. Vol. 19. P. 399.
- 194. Rismana N. et al. Preparation of amine-modified Fe3O 4/carbon nanoparticles by submerged arc discharge in ethylenediamine/ethanol // IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. Vol. 333. P. 012026.
- 195. Васюков Г.Ю. et al. Поверхностно модифицированные магнитные наночастицы для медико-биологического применения // Бюллетень сибирской медицины. Vol. 13, № 6. Р. 33–40.
- 196. Chan B.H.B.S. et al. Carbon-Encapsulated Radioactive Tc Nanoparticles // Adv. Mater. 2004. Vol. 16, № 2. P. 144–149.
- 197. Fan X. et al. Magnetic Fe3O4–graphene composites as targeted drug nanocarriers for pH-activated release. 2013. Vol. 5. P. 1143–1152.
- 198. Li X. et al. Synthesis of 3D Hierarchical Fe3O4/Graphene Composites with High Lithium Storage Capacity and for Controlled Drug Delivery // J. Phys. Chem. C. 2011. Vol. 115, № 44. P. 21567–21573.

- 199. Cong H. et al. Water-Soluble Magnetic-Functionalized Reduced Graphene Oxide Sheets: In situ Synthesis and Magnetic Resonance Imaging Applications // Small. 2010. Vol. 6. P. 169–173.
- 200. Chen W. et al. Composites of Aminodextran-Coated Fe 3 O 4 Nanoparticles and Graphene Oxide for Cellular Magnetic Resonance Imaging // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2011. Vol. 3, № 10. P. 4085–4091.
- 201. Wu W. et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications // Sci. Technol. Adv. Mater. 2015. Vol. 16, № 2. P. 023501.
- 202. Zhou S. et al. Bifunctional luminescent superparamagnetic nanocomposites of CdSe/CdS-Fe3O4 synthesized via a facile method // J. Mater. Chem. 2012. Vol. 22, № 17. P. 8263–8270.
- 203. Shi Y. et al. Novel α-Fe2O3/CdS cornlike nanorods with enhanced photocatalytic performance // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2012. Vol. 4, № 9. P. 4800–4806.
- 204. Yu X. et al. A facile approach to fabrication of bifunctional magnetic-optical Fe3O4@ZnS microspheres // Chem. Mater. 2009. Vol. 21, № 20. P. 4892–4898.
- 205. Liu L. et al. Studies on interaction and illumination damage of CS-Fe3O 4@ZnS:Mn to bovine serum albumin // J. Nanoparticle Res. 2013. Vol. 15, № 1.
- 206. Zhou W. et al. Synthesis of Fe3O4@PbS hybrid nanoparticles through the combination of surface-initiated atom transfer radical polymerization and acidolysis by H2S // J. Nanosci. Nanotechnol. 2011. Vol. 11, № 1. P. 98–105.
- 207. Luo S. et al. Facile and fast synthesis of urchin-shaped Fe3O4@Bi2S3 coreshell hierarchical structures and their magnetically recyclable photocatalytic activity // J. Mater. Chem. 2012. Vol. 22, № 11. P. 4832–4836.
- 208. Xu Y. et al. Multifunctional Fe3O4 cored magnetic-quantum dot fluorescent nanocomposites for RF nanohyperthermia of cancer cells // J. Phys. Chem. C. 2010. Vol. 114, № 11. P. 5020–5026.
- 209. Wang Z. et al. Facile synthesis of superparamagnetic fluorescent Fe3O4/ZnS hollow nanospheres // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 32. P. 11276– 11277.

- 210. Tian Y. et al. Core-shell nanostructure of α-Fe2O3/Fe 3O4: Synthesis and photocatalysis for methyl orange // J. Nanomater. 2011. Vol. 2011.
- 211. Wang X. et al. Multishelled Co3O4-Fe3O4 hollow spheres with even magnetic phase distribution: Synthesis, magnetic properties and their application in water treatment // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21, № 44. P. 17680–17687.
- 212. Kumari S., Singh R.P. Glycolic acid-functionalized chitosan-Co3O4-Fe 3O4 hybrid magnetic nanoparticles-based nanohybrid scaffolds for drug-delivery and tissue engineering // J. Mater. Sci. 2013. Vol. 48, № 4. P. 1524–1532.
- 213. Zhang S. et al. Magnetic Fe3O4@NiO hierarchical structures: preparation and their excellent As(v) and Cr(vi) removal capabilities // RSC Adv. 2013. Vol. 3, № 8. P. 2754.
- 214. Estradé S. et al. Distinguishing the core from the shell in MnO x/MnO y and FeO x/MnO x core/shell nanoparticles through quantitative electron energy loss spectroscopy (EELS) analysis // Micron. 2012. Vol. 43, № 1. P. 30–36.
- 215. Krycka K.L. et al. Resolving Material-Specific Structures within Fe3O4|γ-Mn2O3 Core|Shell Nanoparticles Using Anomalous Small-Angle X-ray Scattering // ACS Nano. 2013. Vol. 7, № 2. P. 921–931.
- 216. Liu Z. et al. Hierarchical magnetic core-shell nanoarchitectures: Non-linker reagent synthetic route and applications in a biomolecule separation system // J. Mater. Chem. 2012. Vol. 22, № 7. P. 2935–2942.
- 217. Wang Y.J., Hussain S.M., Krestin G.P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents : physicochemical characteristics and applications in MR imaging // Eur. Radiol. 2001. Vol. 11. P. 2319–2331.
- 218. Westman C. et al. Surface induced suppression of magnetization in nanoparticles // J. Phys. D. Appl. Phys. 2008. Vol. 41. P. 225003.
- 219. Iglesias O., Labarta A. Finite-size and surface effects in maghemite nanoparticles: Monte Carlo simulations // Phys. Rev. B. 2001. Vol. 63, № 18. P. 184416.
- 220. Iglesias Ò., Labarta A. Role of surface disorder on the magnetic properties and hysteresis of nanoparticles // Phys. B Condens. Matter. 2004. Vol. 343, № 1–4. P. 286–292.
- 221. Kodama R.H., Berkowitz A.E. Surface Spin Disorder in NiFe2O4

Nanoparticles // Phys. Rev. Lett. 1996. Vol. 77. P. 394.

- 222. Chen J.P., Sorensen C.M. Size-dependent magnetic properties of MnFe2O4 fine particles synthesized by coprecipitation // Phys. Rev. B. 1996. Vol. 54, № 13. P. 9288–9296.
- 223. Liu D. et al. Morphology control in synthesis of nickel nanoparticles in the presence of polyvinylpyrrolidone (PVPK30) // J. Mater. Sci. 2008. Vol. 43. P. 1974–1978.
- 224. Chen J.P. et al. Enhanced magnetization of nanoscale colloidal cobalt particles // Phys. Rev. B. 1995. Vol. 51, № 17. P. 11527.
- 225. Berkov D.V. et al. New method for the determination of the particle magnetic moment distribution in a ferrofluid // J. Phys. D. Appl. Phys. 2000. Vol. 33. P. 331–337.
- 226. Held G.A. et al. Competing interactions in dispersions of superparamagnetic nanoparticles // Phys. Rev. B. 2001. Vol. 64. P. 012408.
- 227. Guardia P., Labarta A., Batlle X. Tuning the Size , the Shape , and the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles // J. Phys. Chem. C. 2011. Vol. 155. P. 390–396.
- 228. Pereira C. et al. Superparamagnetic MFe 2O 4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles: Tuning the particle size and magnetic properties through a novel one-step coprecipitation route // Chem. Mater. 2012. Vol. 24, № 8. P. 1496–1504.
- 229. He X., Shi H. Size and shape effects on magnetic properties of Ni nanoparticles // Particuology. 2012. Vol. 10, № 4. P. 497–502.
- 230. Noh S. et al. Nanoscale Magnetism Control via Surface and Exchange Anisotropy for Optimized Ferrimagnetic Hysteresis // Nano Lett. 2012. Vol. 12, № 7. P. 3716–3721.
- 231. Jeong B.U. et al. Superparamagnetic Colloids : Controlled Synthesis and Niche Applications // Adv. Mater. 2007. Vol. 19. P. 33–60.
- Skumryev V. et al. Beating the superparamagnetic limit with exchange bias // Nature. 2003. Vol. 423. P. 19–22.
- 233. Jun Y., Seo J., Cheon J. Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences // Acc. Chem. Res. 2008. Vol. 41, № 2. P. 179–189.

- 234. Guardia P. et al. Surfactant effects in magnetite nanoparticles of controlled size // J. Magn. Magn. Mater. 2007. Vol. 316, № 2. P. 756–759.
- 235. Nagesha D.K. et al. Functionalization-induced improvement in magnetic properties of Fe3 O4 nanoparticles for biomedical applications // J. Appl. Phys. 2009. Vol. 105, № 7. P. 1–4.
- 236. Caruntu D., Caruntu G., O'Connor C.J. Magnetic properties of variable-sized Fe3O4 nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols // J. Phys. D. Appl. Phys. 2007. Vol. 40, № 19. P. 5801–5809.
- 237. Pereira C. et al. Superparamagnetic MFe 2 O 4 (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles : Tuning the Particle Size and Magnetic Properties through a Novel One-Step Coprecipitation Route Joa o. 2012. Vol. 4.
- 238. Krishnan K.M. Biomedical Nanomagnetics: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy // IEEE Trans Magn. 2010. Vol. 46, № 7.
   P. 2523–2558.
- 239. Demortière A. et al. Size-dependent properties of magnetic iron oxide nanocrystals // Nanoscale. 2011. Vol. 3. P. 225–232.
- 240. Guardia P. et al. Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Speci fi c Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 4. P. 3080–3091.
- 241. Jang J. et al. Critical enhancements of MRI contrast and hyperthermic effects by dopant-controlled magnetic nanoparticles // Angew Chem Int Ed Engl. 2009. Vol. 48, № 7. P. 1234–1238.
- 242. Chung S.H. et al. Biological sensors based on Brownian relaxation of magnetic nanoparticles // Appl. Phys. Lett. 2004. Vol. 85, № 14. P. 2971– 2973.
- 243. Fortin J.P. et al. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 9. P. 2628–2635.
- 244. Jeun M. et al. Physical limits of pure superparamagnetic Fe3O4 nanoparticles for a local hyperthermia agent in nanomedicine // Appl. Phys. Lett. 2012. Vol. 100, № 9. P. 3–7.
- 245. Lartigue L. et al. Water-dispersible sugar-coated iron oxide nanoparticles. An evaluation of their relaxometric and magnetic hyperthermia properties // J.

Am. Chem. Soc. 2011. Vol. 133, № 27. P. 10459–10472.

- 246. Gonzales-Weimuller M., Zeisberger M., Krishnan K.M. Size-dependant heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia // J. Magn. Magn. Mater. 2009. Vol. 321, № 13. P. 1947–1950.
- 247. Kolhatkar A.G. et al. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles // Int. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14, № 8. P. 15977–16009.
- 248. Müller R. et al. Magnetic heating effect of nanoparticles with different sizes and size distributions // J. Magn. Magn. Mater. 2013. Vol. 328. P. 80–85.
- 249. Khandhar A.P. et al. Tailored magnetic nanoparticles for optimizing magnetic fluid hyperthermia // J. Biomed. Mater. Res. Part A. 2012. Vol. 100 A, № 3. P. 728–737.
- 250. Carrey J., Mehdaoui B., Respaud M. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization // J. Appl. Phys. 2011. Vol. 109, № 8. P. 1–17.
- 251. Leem G. et al. Surfactant-Controlled Size and Shape Evolution of Magnetic Nanoparticles // Cryst. Growth Des. 2009. Vol. 9. P. 32–34.
- Yan M., Fresnais J., Berret J. Growth mechanism of nanostructured superparamagnetic rods obtained by electrostatic co-assembly // Soft Matter. 2010. Vol. 6. P. 1997–2005.
- 253. Hu C.W., Lin L., Shau N.-L. Magnetic nanowires via template electrodeposition // J. Solid State Electrochem. 2006. Vol. 10. P. 198–202.
- 254. Comesana-Hermo M. et al. Stable single domain Co nanodisks : synthesis , structure and magnetism // J. Mater. Chem. 2012. Vol. 22. P. 8043–8047.
- 255. Srikala D. et al. Synthesis and Characterization of Ferromagnetic Cobalt Nanospheres, Nanodiscs and Nanocubes // J. Nanosci. Nanotechnol. 2009. Vol. 9, № 9. P. 5627–5632.
- 256. Roca A.G. et al. Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D. Appl. Phys. 2009. Vol. 42. P. 224002.
- 257. Schladt T.D. et al. Au@MnO Nanoflowers : Hybrid Nanocomposites for Selective Dual Functionalization and Imaging // Angew. Chemie Int. Ed. 2010. Vol. 49, № 23. P. 3976–3980.

- 258. Song Q., Zhang Z.J. Shape Control and Associated Magnetic Properties of Spinel Cobalt Ferrite Nanocrystals // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 19. P. 6164–6168.
- 259. Salazar-Alvarez G. et al. Cubic versus Spherical Magnetic Nanoparticles: The Role of Surface Anisotropy // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130, № 40. P. 13234–13239.
- 260. Wang L.B., Song L.X., Dang Z. Controlled growth and magnetic properties of α-Fe2O3nanocrystals: Octahedra, cuboctahedra and truncated cubes // CrystEngComm. 2012. Vol. 14. P. 3355–3358.
- Zhen G. et al. Comparative Study of the Magnetic Behavior of Spherical and Cubic Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles // J. Phys. Chem. C. 2011. Vol. 115. P. 327–334.
- 262. De Montferrand C. et al. Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection // Acta Biomater. Acta Materialia Inc., 2012. Vol. 9, № 4.
- 263. Wang Y.-X.J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. // Quant. Imaging Med. Surg. 2011. Vol. 1, № 1. P. 35–40.
- 264. Joshi H.M. et al. Effects of shape and size of cobalt ferrite nanostructures on their MRI contrast and thermal activation // J. Phys. Chem. C. 2009. Vol. 113, № 41. P. 17761–17767.
- 265. Caravan P. et al. Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T1 contrast agents // Contrast Media Mol. Imaging. 2009. Vol. 4, № 2. P. 89–100.
- 266. Jun Y.W., Lee J.H., Cheon J. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging // Angew. Chemie - Int. Ed. 2008. Vol. 47, № 28. P. 5122–5135.
- 267. Colombo M. et al. Biological applications of magnetic nanoparticles // Chem.
   Soc. Rev. 2012. Vol. 41, № 11. P. 4306–4334.
- 268. Lee N. et al. Water-dispersible ferrimagnetic iron oxide nanocubes with extremely high r 2 relaxivity for highly sensitive in vivo MRI of tumors // Nano Lett. 2012. Vol. 12, № 6. P. 3127–3131.

- 269. Fantechi E. et al. Exploring the effect of Co doping in fine maghemite nanoparticles // J. Phys. Chem. C. 2012. Vol. 116, № 14. P. 8261–8270.
- 270. Larumbe S. et al. Ni doped Fe3O4 magnetic nanoparticles // J. Nanosci. Nanotechnol. 2012. Vol. 12, № 3. P. 2652–2660.
- 271. Sato Turtelli R. et al. Interplay between the cation distribution and production methods in cobalt ferrite // Mater. Chem. Phys. Elsevier B.V., 2012. Vol. 132, № 2–3. P. 832–838.
- 272. Deng H. et al. Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres // Angew. Chemie Int. Ed. 2005. Vol. 44, № 18. P. 2782–2785.
- 273. Lee J.-H. et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultrasensitive molecular imaging. // Nat. Med. 2007. Vol. 13, № 1. P. 95–99.
- 274. Mahmoudi M., Kavanlouei M. Effect of Composition on Structural and Magnetic Properties of Nanocrystalline Ferrite Li0.5Smx Fe2.5–xO4 // Powder Metall. Met. Ceram. 2015. Vol. 54. P. 31–39.
- 275. Clavel G. et al. Solvent dependent shape and magnetic properties of doped ZnO nanostructures // Adv. Funct. Mater. 2007. Vol. 17, № 16. P. 3159–3169.
- 276. Tzitzios V. et al. Synthesis of air stable FeCo nanoparticles // J. Appl. Phys. 2011. Vol. 109, № 7. P. 109–112.
- 277. Chinnasamy C. et al. Gram scale synthesis of high magnetic moment Fe 100xCo x alloy nanoparticles: Reaction mechanism, structural and magnetic properties and its application on nanocomposite // J. Appl. Phys. 2012. Vol. 111, № 7. P. 7–10.
- 278. Grasset F. et al. Synthesis, magnetic properties, surface modification and cytotoxicity evaluation of Y3Fe5-xAlxO12 (0≤x≤2) garnet submicron particles for biomedical applications // J. Magn. Magn. Mater. 2001. Vol. 234, № 3. P. 409–418.
- 279. Phuc N.X. et al. Tuning of the curie temperature in La1-xSrxMn 1-yTiyO3 // J. Korean Phys. Soc. 2008. Vol. 52, № 5. P. 1492–1495.
- 280. Miller K.J. et al. Metastable γ -FeNi nanostructures with tunable Curie temperature // J. Appl. Phys. 2010. Vol. 107, № 9. P. 1–4.
- Larumbe S. et al. Effect of a SiO2 coating on the magnetic properties of Fe3O4 nanoparticles // J. Phys. Condens. Matter. 2012. P. 266007.

- 282. Larumbe S. et al. Sol-gel NiFe2O4 nanoparticles : Effect of the silica coating // J. Appl. Phys. 2012. Vol. 111. P. 103911.
- 283. Vestal C.R., Zhang Z.J. Synthesis and Magnetic Characterization of Mn and Co Spinel Ferrite-Silica Nanoparticles with Tunable Magnetic Core // Nano Lett. 2003. Vol. 3, № 12. P. 1739–1743.
- 284. A K.W., Hong J., Ahn J. Synthesis and surface modification of hydrophobic magnetite to processible magnetite@silica-propylamine // J. Magn. Magn. Mater. 2005. Vol. 293, № 1. P. 177–181.
- 285. Feng B. et al. Synthesis of Fe3O4/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2008. Vol. 328, № 1–3. P. 52–59.
- 286. Hong R.Y. et al. Synthesis , characterization and MRI application of dextrancoated Fe3O4 magnetic nanoparticles // Biochem. Eng. J. 2008. Vol. 42, № 3. P. 290–300.
- 287. Ye F. et al. Uniform mesoporous silica coated iron oxide nanoparticles as a highly efficient, nontoxic MRI T2 contrast agent with tunable proton relaxivities // Contrast Media Mol. Imaging. 2012. Vol. 7, № November 2011. P. 460–468.
- 288. Yang S.-C., Ahn C.-W., Park C.-S. Controlled synthesis of MnFe2O4–Ni core–shell nanoparticles // J. Mater. Sci. 2010. Vol. 45. P. 1419–1424.
- 289. Shamim N. et al. Thermosensitive polymer (N -isopropylacrylamide) coated nanomagnetic particles: Preparation and characterization // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2007. Vol. 55, № 1. P. 51–58.
- 290. Ebbing A. et al. Tuning the magnetic properties of Co nanoparticles by Pt capping // Phys. Rev. B. 2011. Vol. 84. P. 012405.
- 291. Zeng H. et al. Bimagnetic Core/Shell FePt/Fe3O4 Nanoparticles // Nano Lett.
  2004. Vol. 4, № 1. P. 3–6.
- 292. Lee J. et al. Exchange-Coupled Magnetic Nanoparticles for Efficient Heat Induction // Nat. Nanotechnol. 2011. Vol. 6. P. 418–422.
- 293. Nikitin A.A. et al. Synthesis of Iron Oxide Nanoclusters by Thermal Decomposition // Langmuir. 2018. Vol. 34, № 15. P. 4640–4650.
- 294. Waldron R.D. Infrared spectra of ferrites // Phys. Rev. 1955. Vol. 99, № 6. P. 1727–1735.

- 295. Kouassi G.K., Irudayaraj J., McCarty G. Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles // Biomagn. Res. Technol. 2005. Vol. 3. P. 1.
- 296. Dabagh S. et al. Study of structural phase transformation and hysteresis behavior of inverse-spinel α-ferrite nanoparticles synthesized by coprecipitation method // Results Phys. 2018. Vol. 8. P. 93–98.
- 297. Lee J.S. et al. Magnetic multi-granule nanoclusters: A model system that exhibits universal size effect of magnetic coercivity // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 12135.
- 298. Nelson J.B., Riley D.P. An experimental investigation of extrapolation methods in the derivation of accurate unit-cell dimensions of crystals // Proc. Phys. Soc. 1945. Vol. 57. P. 160.
- 299. Karaagac O., Yildiz B.B., Köçkar H. The influence of synthesis parameters on one-step synthesized superparamagnetic cobalt ferrite nanoparticles with high saturation magnetization // J. Magn. Magn. Mater. 2019. Vol. 473. P. 262–267.
- 300. Kallumadil M. et al. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia // J. Magn. Magn. Mater. 2009. Vol. 321, № 10. P. 1509–1513.
- 301. Sakellari D. et al. Exploring multifunctional potential of commercial ferrofluids by magnetic particle hyperthermia // J. Magn. Magn. Mater. 2015. Vol. 380. P. 360–364.
- 302. Chen Y.J. et al. Characterization and in vitro cellular uptake of PEG coated iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent // Pharmazie. 2010. Vol. 65, № 7. P. 481–486.
- 303. Black K.C.L. et al. Radioactive 198 Au-Doped Nanostructures with Different Shapes for In Vivo Analyses of Their Biodistribution, Tumor Uptake, and Intratumoral Distribution // ACS Nano. 2014. Vol. 8, № 5. P. 4385–4394.
- 304. Naumenko V. et al. Biodistribution and Tumors MRI Contrast Enhancement of Magnetic Nanocubes, Nanoclusters, and Nanorods in Multiple Mice Models // Contrast Media Mol. Imaging. 2018. Vol. 2018. P. 1–12.
- 305. Park J. et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals // Nat. Mater. 2004. Vol. 3, № 12. P. 891–895.
- 306. Sadeghi O., Zakharov L.N., Nyman M. Aqueous formation and manipulation

of the iron-oxo Keggin ion // Science (80-. ). 2015. Vol. 347, № 6228. P. 1359–1362.

- 307. Zhao Z. et al. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T<sub>2</sub> contrast agents for magnetic resonance imaging. // Nat. Communications. 2013. Vol. 4. P. 2266.
- 308. Nikitin A. et al. Synthesis of iron oxide nanorods for enhanced magnetic hyperthermia // J. Magn. Magn. Mater. 2019. Vol. 469. P. 443–449.
- 309. Orza A. et al. One-Step Facile Synthesis of Highly Magnetic and Surface Functionalized Iron Oxide Nanorods for Biomarker-Targeted Applications // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. Vol. 9, № 24. P. 20719–20727.
- 310. Toyos-Rodríguez C. et al. A Simple and Reliable Synthesis of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles by Thermal Decomposition of Fe(acac) 3 // J. Nanomater. 2019. Vol. 2019. P. 1–10.
- 311. de la Presa P. et al. Structural and magnetic characterization of oleic acid and oleylamine-capped gold nanoparticles // J. Appl. Phys. 2006. Vol. 100, № 12.
- 312. Lastovina T.A. et al. Microwave-assisted synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles in oleylamine–oleic acid solutions // Mendeleev Commun. 2017. Vol. 27, № 5. P. 487–489.
- Farahmandjou M. Effect of oleic acid and oleylamine surfactants on the size of FePt nanoparticles // J. Supercond. Nov. Magn. 2012. Vol. 25. P. 2075– 2079.
- 314. Nikitin A. et al. Synthesis, characterization and MRI application of magnetite water-soluble cubic nanoparticles // J. Magn. Magn. Mater. 2017. Vol. 441.
   P. 6–13.
- 315. Perez De Berti I.O. et al. Alternative low-cost approach to the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by thermal decomposition of organic precursors // Nanotechnology. 2013. Vol. 24, № 17.
- 316. Song L. et al. Influence of Reaction Solvent on Crystallinity and Magnetic Properties of MnFe 2 O 4 Nanoparticles Synthesized by Thermal Decomposition // J. Nanomater. 2016. Vol. 2016. P. 1–8.
- 317. Shao H. et al. Effect of surfactants on modifying the surface of magnetic nanoparticles by thermal decomposition // Adv. Mater. Res. 2011. Vol. 335–336. P. 951–955.
- 318. Shao H. et al. Effect of surfactants on the size and shape of cobalt nanoparticles synthesized by thermal decomposition // J. Appl. Phys. 2006. Vol. 99, № 8. P. 08N702.
- 319. Shamsuri A.A., Md Jamil S.N.A. A short review on the effect of surfactants on the mechanico-thermal properties of polymer nanocomposites // Appl. Sci. 2020. Vol. 10, № 14. P. 4867.
- 320. Klekotka U. et al. Importance of surfactant quantity and quality on growth regime of iron oxide nanoparticles // Materials (Basel). 2020. Vol. 13, № 7. P. 1747.
- 321. Moya C., Batlle X., Labarta A. The effect of oleic acid on the synthesis of Fe3-xO4 nanoparticles over a wide size range // Phys. Chem. Chem. Phys. 2015. Vol. 17, № 41. P. 27373–27379.
- 322. Masui K., Cloughesy T.F., Mischel P.S. Molecular pathology in adult highgrade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2012. Vol. 38, № 3. P. 271–291.
- 323. Li B. et al. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin // Oncogene. 2004. Vol. 23, № 26. P. 4594–4602.
- 324. Sadeghi L., Tanwir F., Yousefi Babadi V. In vitro toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on Hep G2 cells // Exp. Toxicol. Pathol. 2015. Vol. 67, № 2. P. 197–203.
- 325. Gao Z. et al. Late ROS accumulation and radiosensitivity in SOD1overexpressing human glioma cells // Free Radic. Biol. Med. 2008. Vol. 45, № 11. P. 1501–1509.
- 326. Lee H.C. et al. Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. // Int. J. Mol. Med. 2004. Vol. 13, № 6. P. 883–887.
- 327. Hayyan M., Hashim M.A., Alnashef I.M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications // Chemical Reviews. 2016. Vol. 116, № 5. P. 3029– 3085.
- 328. Okada S. Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals. // Pathol. Int. 1996. Vol. 46, № 5. P. 311–332.

- 329. Yu M. et al. Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture // Int. J. Mol. Sci. 2012. Vol. 13, № 5. P. 5554–5570.
- Zavisova V. et al. The cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different modifications evaluated in vitro // J. Magn. Magn. Mater. 2015. Vol. 380. P. 85–89.
- 331. Venkataraman S. et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier, 2011. Vol. 63, № 14–15. P. 1228–1246.
- 332. Park J.-H. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging // Adv. Mater. 2008. Vol. 20, № 9. P. 1630–1635.
- 333. Park J.-H. et al. Systematic Surface Engineering of Magnetic Nanoworms for In vivo Tumor Targeting // Small. 2009. Vol. 5, № 6. P. 694–700.
- 334. Wilhelm S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // Nat. Rev. Mater. 2016. Vol. 1, № 5. P. 16014.
- 335. Larsen B.A. et al. Controlled aggregation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for the development of molecular magnetic resonance imaging probes // Nanotechnology. 2008. Vol. 19, № 26. P. 265102.
- 336. Lartigue L. et al. Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 12. P. 10935–10949.
- 337. Kostopoulou A. et al. Colloidal assemblies of oriented maghemite nanocrystals and their NMR relaxometric properties // Dalt. Trans. 2014. Vol. 43, № 22. P. 8395–8404.
- 338. Akash M.S.H., Rehman K. Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives // J. Control. Release. 2015. Vol. 209. P. 120–138.
- 339. Batrakova E. V., Kabanov A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers // Journal of Controlled Release. 2008.
- 340. Ranganathan R. et al. Nanomedicine: towards development of patientfriendly drug-delivery systems for oncological applications. // Int. J. Nanomedicine. 2012. Vol. 7. P. 1043–1060.

- 341. Melancon M.P., Lu W., Li C. Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy // MRS Bull. 2009. Vol. 34, № 06. P. 415–421.
- 342. Albanese A., Tang P.S., Chan W.C.W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems // Annu. Rev. Biomed. Eng. Annual Reviews, 2012. Vol. 14, № 1. P. 1–16.
- 343. Cho M. et al. Assembly of Iron Oxide Nanocubes for Enhanced Cancer Hyperthermia and Magnetic Resonance Imaging // Nanomaterials. 2017. Vol. 7, № 4. P. 72.
- 344. Yang L. et al. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice // Nanoscale. 2015. Vol. 7, № 2. P. 625–636.
- 345. Arami H. et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles // Chem. Soc. Rev. 2015. Vol. 44, № 23. P. 8576–8607.
- 346. Kievit F.M. et al. Targeting of Primary Breast Cancers and Metastases in a Transgenic Mouse Model Using Rationally Designed Multifunctional SPIONs // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 3. P. 2591–2601.
- 347. Xu H. et al. Polymer encapsulated upconversion nanoparticle/iron oxide nanocomposites for multimodal imaging and magnetic targeted drug delivery // Biomaterials. 2011. Vol. 32, № 35. P. 9364–9373.
- 348. Chaves S.B. et al. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice // IEEE Trans. Magn. 2002. Vol. 38, № 5. P. 3231–3233.
- 349. Mejías R. et al. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy // Biomaterials. 2011. Vol. 32, № 11. P. 2938–2952.
- 350. Muro S. et al. Control of Endothelial Targeting and Intracellular Delivery of Therapeutic Enzymes by Modulating the Size and Shape of ICAM-1-targeted Carriers // Mol. Ther. 2008. Vol. 16, № 8. P. 1450–1458.
- 351. Jones S.W. et al. Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background // J. Clin. Invest. 2013. Vol. 123, № 7. P. 3061–3073.
- 352. Nakamura Y. et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? // Bioconjug. Chem. 2016.

Vol. 27, № 10. P. 2225–2238.

- 353. Kim J.S. et al. Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice // Toxicol. Sci. 2006. Vol. 89, № 1. P. 338–347.
- 354. Gu L. et al. In Vivo Clearance and Toxicity of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystals // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 6. P. 4947–4954.
- 355. Zanganeh S. et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues // Nat. Nanotechnol. 2016. Vol. 11, № 11. P. 986–994.
- 356. Ittrich H. et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Biomedicine: Applications and Developments in Diagnostics and Therapy // RöFo -Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgeb. Verfahren. 2013. Vol. 185, № 12. P. 1149–1166.
- 357. Jain T.K. et al. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats // Mol. Pharm. 2008. Vol. 5, № 2. P. 316–327.
- 358. Weissleder R. et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity // Am. J. Roentgenol. 1989. Vol. 152, № 1. P. 167–173.
- 359. Tietze R. et al. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. Vol. 468, № 3. P. 463–470.
- 360. Vakilinezhad M.A., Alipour S., Montaseri H. Fabrication and in vitro evaluation of magnetic PLGA nanoparticles as a potential Methotrexate delivery system for breast cancer // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2018. Vol. 44, № February. P. 467–474.
- 361. Avedian N. et al. pH-sensitive biocompatible mesoporous magnetic nanoparticles labeled with folic acid as an efficient carrier for controlled anticancer drug delivery // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2018. Vol. 44. P. 323–332.
- 362. Nosrati H. et al. Bovine Serum Albumin (BSA) coated iron oxide magnetic nanoparticles as biocompatible carriers for curcumin-anticancer drug // Bioorg. Chem. 2018. Vol. 76. P. 501–509.
- 363. Monteiro A.P.F. et al. Magnetic nanoparticles coated with cyclodextrins and citrate for irinotecan delivery // Carbohydr. Polym. 2017. Vol. 163. P. 1–9.
- 364. Fellows B.D. et al. In vitro studies of heparin-coated magnetic nanoparticles

for use in the treatment of neointimal hyperplasia // Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 2018. Vol. 14, № 4. P. 1191–1200.

- 365. Yoo D. et al. Theranostic magnetic nanoparticles // Acc. Chem. Res. 2011.
  Vol. 44, № 10. P. 863–874.
- 366. Kandasamy G., Maity D. Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics // Int. J. Pharm. 2015. Vol. 496, № 2. P. 191–218.
- 367. Li K., Nejadnik H., Daldrup-Link H.E. Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics // Drug Discov. Today. 2017. Vol. 22, № 9. P. 1421–1429.
- 368. Arnaut L.G. et al. Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: The role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers // Chem. - A Eur. J. 2014. Vol. 20, № 18. P. 5346–5357.
- 369. Rocha L.B. et al. Elimination of primary tumours and control of metastasis with rationally designed bacteriochlorin photodynamic therapy regimens // Eur. J. Cancer. 2015. Vol. 51, № 13. P. 1822–1830.
- 370. Kawczyk-Krupka A. et al. Treatment of localized prostate cancer using WST-09 and WST-11 mediated vascular targeted photodynamic therapy—A review // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2015. Vol. 12, № 4. P. 567–574.
- 371. Krzykawska-Serda M. et al. The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy // Free Radical Biology and Medicine. 2014. Vol. 73. 239–251 p.
- 372. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one Photosensitizers, photochemistry and cellular localization // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2004. Vol. 1, № 4. P. 279–293.
- 373. Peng Q. Chapter 4 Correlation of intracellular and intratumoral photosensitizer distribution with photodynamic effect // Compr. Ser. Photosciences. 2001. Vol. 2. P. 55–66.
- 374. Sobolev A.S., Jans D.A., Rosenkranz A.A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2000. Vol. 73, № 1. P. 51–90.
- 375. Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity // Adv. Drug Deliv. Rev. 2015. Vol. 91. P. 3–6.

- 376. Pantiushenko I. V et al. Development of bacteriochlorophyll a-based nearinfrared photosensitizers conjugated to gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer // Biochem. 2015. Vol. 80, № 6. P. 752–762.
- 377. Roohi F. et al. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles // Int. J. Nanomedicine. 2012. Vol. 7. P. 4447–4458.
- 378. Ferguson R.M., Minard K.R., Krishnan K.M. Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging // J. Magn. Magn. Mater. 2009. Vol. 321, № 10. P. 1548–1551.
- 379. Arami H. et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles // Chem. Soc. Rev. 2015. Vol. 42, № 12. P. 4906.
- 380. Sharifi I., Shokrollahi H., Amiri S. Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications // J. Magn. Magn. Mater. 2012. Vol. 324, № 6. P. 903–915.
- 381. Efremova M. V et al. Size-selected Fe 3 O 4 –Au hybrid nanoparticles for improved magnetism-based theranostics // Beilstein J. Nanotechnol. 2018. Vol. 9, № 1. P. 2684–2699.
- 382. Tomitaka A. et al. Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using HeLa cells // J. Magn. Magn. Mater. 2009. Vol. 321, № 10. P. 1482–1484.
- 383. Ahamed M. et al. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells // Toxicology. 2011. Vol. 283, № 2–3. P. 101–108.
- 384. Kumar R. et al. Localized cancer treatment by radio-frequency hyperthermia using magnetic nanoparticles immobilized on graphene oxide: from novel synthesis to in vitro studies // J. Mater. Chem. B. 2018. Vol. 6, № 33. P. 5385–5399.
- 385. Haghniaz R., Umrani R.D., Paknikar K.M. Temperature-dependent and timedependent effects of hyperthermia mediated by dextran-coated La0.7Sr0.3MnO3: in vitro studies // Int. J. Nanomedicine. 2015. Vol. 10. P. 1609–1623.
- 386. Kumari S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival // Biomark. Insights. 2018. Vol. 13.

- 387. Chaiswing L., Clair W.H.S., Clair D.K.S. Redox Paradox: A Novel Approach to Therapeutics-Resistant Cancer // Antioxid. Redox Signal. 2018. Vol. 29, № 13. P. 1237–1272.
- 388. Zhu C. et al. No evident dose-response relationship between cellular ROS level and its cytotoxicity – a paradoxical issue in ROS-based cancer therapy // Sci. Rep. 2014. Vol. 4, № 1. P. 1–10.
- 389. Li G.C. et al. Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992. Vol. 89, № 6. P. 2036.
- 390. Stangl S. et al. Preclinical Evaluation of the Hsp70 Peptide Tracer TPP-PEG 24-DFO[ 89 Zr] for Tumor-Specific PET/CT Imaging // Cancer Res. 2018. Vol. 78, № 21. P. 6268–6281.
- 391. Abe H. et al. Identification of a highly immunogenic mouse breast cancer sub cell line, 4T1-S // Hum. Cell. 2016. Vol. 29, № 2. P. 58–66.
- 392. Kim K. et al. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2014. Vol. 111, № 32. P. 11774–11779.
- 393. Fukami T. et al. Hyperthermia induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) and apoptosis in human glioma cell lines // J. Neurooncology. 2004. Vol. 70, № 3. P. 319–331.
- 394. Wu H. et al. Injectable thermosensitive magnetic nanoemulsion hydrogel for multimodal-imaging-guided accurate thermoablative cancer therapy // Nanoscale. 2017. Vol. 9, № 42. P. 16175–16182.
- 395. Zhang Y. et al. Thermal ablation versus conventional regional hyperthermia has greater anti-tumor activity against melanoma in mice by upregulating CD4+ cells and enhancing IL-2 secretion // Prog. Nat. Sci. 2009. Vol. 19, № 12. P. 1699–1704.
- 396. Wang H. et al. Abscopal antitumor immune effects of magnet-mediated hyperthermia at a high therapeutic temperature on Walker-256 carcinosarcomas in rats // Oncol. Lett. 2014. Vol. 7, № 3. P. 764.
- 397. Skitzki J.J., Repasky E.A., Evans S.S. Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2009. Vol. 10, № 6. P. 550.
- 398. Mironov A.F. et al. Synthesis and Investigation of Photophysical and

Biological Properties of Novel S-Containing Bacteriopurpurinimides // J. Med. Chem. 2017. Vol. 60, № 24. P. 10220–10230.

- 399. Garanina A.S. et al. Temperature-controlled magnetic nanoparticles hyperthermia inhibits primary tumor growth and metastases dissemination // Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 2020. Vol. 25. P. 102171.
- 400. Hergt R., Dutz S. Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy // J. Magn. Magn. Mater. 2007. Vol. 311, № 1. P. 187–192.
- 401. Oleson J.R., Heusinkveld R.S., Manning M.R. Hyperthermia by magnetic induction: II. Clinical experience with concentric electrodes // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1983. Vol. 9, № 4. P. 549–556.