

ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА КОНЪЮГАТОВ ДОКСОРУБИЦИНА С БИОСОВМЕСТИМЫМИ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА

К. М. Старостин¹✉, А. Ю. Оленин², Т. А. Федотчева¹, К. Е. Широких¹, Г. В. Лисичкин², Н. Л. Шимановский¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Супермагнитные наночастицы магнетита могут быть эффективными магнитно-резонансными контрастными веществами и платформой для направленного транспорта цитостатиков к опухоли. В статье представлено описание нового модифицированного метода синтеза золь суперпарамагнитных наночастиц магнетита (Fe_3O_4) размером менее 10 нм, послойно поверхностно стабилизированных олеиновой кислотой и неионогенным поверхностно-активным веществом полисорбатом 80. Релаксивность полученной субстанции составила $r_1 = 9,8$, $r_2 = 94 \text{ mM}^{-1} \times \text{с}^{-1}$. Проведена эффективная конъюгация наночастиц Fe_3O_4 и доксорубина (эффективность конъюгации — 90 %). Оцененное высвобождение доксорубина не превышало 5 %, тогда как воздействие ультразвукового излучения увеличивало высвобождение доксорубина до 21 %. Конъюгация доксорубина обеспечивала повышение цитотоксичности лекарственного вещества *in vitro*. Полученные наночастицы магнетита обладают диагностическим потенциалом в качестве контрастного вещества для магнитно-резонансной томографии и могут служить основой для систем адресной доставки и контролируемого высвобождения химиотерапевтических средств, в частности доксорубина.

Ключевые слова: супермагнитные наночастицы оксида железа, СНОЖ, наночастицы магнетита, доксорубин, антипролиферативные свойства конъюгатов, ультразвуковое триггер-зависимое высвобождение лекарственного вещества, наноконтейнеры, терапевтическая субстанция

✉ Для корреспонденции: Кирилл Максимович Старостин
117997, Москва, ул. Островитянова, 1; kirill_ms@yahoo.com

Статья поступила: 16.09.2015 Статья принята в печать: 09.11.2015

BIOCOMPATIBLE DOXORUBICIN-LOADED SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES: SYNTHESIS AND ANTINEOPLASTIC ACTIVITY

Starostin KM¹✉, Olenin AY², Fedotcheva TA¹, Shirokikh KE¹, Lisichkin GV², Shimanovsky NL¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Lomonosov Moscow State University, Moscow

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) can be an effective magnetic resonance contrast agent and a platform for targeted delivery of antineoplastic agent into tumor tissue. This research is dedicated to a new synthesis modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) $d < 10 \text{ nm}$ layer-by-layer stabilized with oleic acid and nonionic surfactant, Tween-80. Relaxivity of the substance was $r_1 = 9,8$, $r_2 = 94 \text{ mM}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$. An effective conjugation with doxorubicin was performed (estimated conjugation efficacy: 90 %). Evaluated doxorubicin release from conjugate was not higher than 5 %, whereas ultrasound radiation enhanced drug release up to 21 %. Doxorubicin conjugated with nanoparticles shown higher antineoplastic activity than free doxorubicin molecules while investigating cytotoxicity *in vitro*. Obtained magnetite nanoparticles bear a diagnostic potential as a magnetic resonance contrast agent and also, it can serve as a platform for designing targeted drug delivery systems as well as providing antineoplastic agents controlled release, in particular, doxorubicin.

Keywords: superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION, magnetite nanoparticles, doxorubicin, antineoplastic properties of nanocomplexes, ultrasound-triggered drug release, nanocarriers, theranostic approach

✉ Correspondence should be addressed: Kirill Starostin
1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997; kirill_ms@yahoo.com

Received: 16.09.2015 Accepted: 09.11.2015

Важнейшими задачами современной онкологии являются разработка высокоточных методов диагностики опухолевых заболеваний и визуализации патологических очагов до, во время и после проведения курса терапии (для оценки ее эффективности), а также повышение эффективности и избирательности химиотерапии опухолей. Для решения этих задач в последнее время все шире используются нанотехнологии. Достаточно хорошие перспективы в данной области имеют наночастицы оксидов железа [1, 2]. Эти частицы, как прави-

ло, представляют собой структуру «ядро–оболочка», где ядро состоит непосредственно из оксида железа, а оболочка — из функционального слоя, включающего стабилизатор поверхности и вещество-вектор адресной доставки, лекарственное средство. Биосовместимые химически модифицированные наночастицы магнетита, обладающие суперпарамагнитными свойствами, являются эффективными магнитно-резонансными контрастными веществами [3], однако, несмотря на интенсивные исследования в данной области [4–6], до сих пор

ни одна субстанция не достигла стадии регистрации и клинического применения, что связано с трудностью их воспроизводимого синтеза, сложностью обратимой конъюгации с цитостатиками, получения стабильных и однородных лекарственных форм, готовых для клинического применения. В данной статье показан потенциал нового модифицированного метода синтеза наночастиц, конъюгированных с доксорубицином через гидрофобные взаимодействия, исследованы физико-химические свойства полученных наноконструктов. Для стабилизации наночастиц магнетита использовали олеиновую кислоту и поверхностно-активное вещество (ПАВ) на основе этиленгликоля (Tween-80, полисорбат 80).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение золь наночастиц магнетита

Синтез наночастиц проводили с использованием модифицированной методики, описанной К. Т. Jain и соавт. [7]. Навески 0,488 г хлорида железа (III) (хлорид железа (III) 6-водный 98 % (Ч), «Химмед Синтез», Россия) и 0,417 г сульфата железа (II) (железо (II) сернокислое 7-водное (ХЧ), «Химмед Синтез», Россия) растворяли в 30 и 15 мл дистиллированной воды соответственно (рН $\leq 0,1$, температура 20 °С). Полученные растворы смешивали, нагревали до 60 °С, а затем в поле ультразвуковой ванны (35 кГц, ПСБ-2835-05, Россия) в течение 10 мин вводили 0,315 мл олеиновой кислоты (олеиновая кислота (Ч), «Химмед Синтез»), после чего дополнительно озвучивали в течение 10 мин. Затем в полученную реакционную массу при непрерывной ультразвуковой обработке в течение 5 мин вводили 4,5 мл раствора, содержавшего 1,5 мл аммиачной воды (аммиак водный 25 % (ОСЧ), «Химмед Синтез»).

После введения аммиака система приобретала характерный черный цвет магнетита. Полученную таким образом реакционную массу дополнительно озвучивали при той же температуре в течение 30 мин. После формирования золь наночастиц, стабилизированных олеиновой кислотой, в него вводили 3 мл водного раствора, содержавшего 0,225 мл неионогенного ПАВ Tween-80 (полисорбат 80, Sharlau, Испания), и дополнительно выдерживали в ультразвуковом поле при той же температуре 30 мин. По окончании синтеза полученный золь поверхностно модифицированных наночастиц магнетита охлаждали до комнатной температуры, подвергали центрифугированию при 10 000 об./мин в течение 15 мин (при 20 °С), а надосадочную жидкость (50 мл) помещали в диализный мешок диаметром 46 мм с размерами пор 3,5 кДа (Membrane Filtration Products, Inc., США) и выдерживали во внешней дистиллированной воде (100 мл) при периодической ее замене (2 раза в сутки) в течение 10 сут (при 20 °С). Полученный таким образом золь дополнительно подвергали центрифугированию при 10 000 об./мин в течение 15 мин (при 20 °С). В дальнейших исследованиях в течение 2 мес (рассмотрено подробнее далее) использовали надосадочную жидкость золь наночастиц магнетита.

Определение концентрации железа и рН в полученном золе

Концентрацию железа в полученном золе определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием прибора «Х-арт М» (Россия) [8]. На основе предварительно приготовленных растворов сульфата железа (II) с концентрациями железа 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 7,5 и 10 мг/мл была построена калибровочная кривая для оценки концентрации железа в ис-

следуемом золе. Измерение рН проводили при температуре 20 °С с помощью рН-метра Hanna Checker 1 (Германия).

Измерение размеров, гидродинамического радиуса и дзета-потенциала наночастиц

Микрофотографии образцов золь получали на просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия) с рабочим ускоряющим напряжением 100 кВ. Образцы готовили путем нанесения 1–2 мкл золь на покрытую формваром медную сетку ($d = 3,05$ мм), которую затем высушивали на воздухе. Анализ электронных микрофотографий проводили с помощью программы NIH Image J. Гистограммы распределения частиц по размерам были построены на основе анализа пяти микрофотографий, каждая из которых содержала не менее 100 индивидуальных наночастиц.

Дзета-потенциалы, кривые распределения частиц по размерам регистрировали с помощью анализатора Malvern ZETASIZER nano-ZS (Великобритания) по стандартным методикам с использованием программного обеспечения прибора.

Конъюгация наночастиц магнетита с доксорубицином

Непосредственно перед конъюгацией проводили гидрофобизацию фармацевтического препарата доксорубицина гидрохлорида (порошок лиофилизированный для инъекций 50 мг «Доксорубин-Тева», Голландия) при незначительном изменении метода, описанного S. Yolles и соавт. [9]. Для этого 20,1 мг доксорубицина гидрохлорида растворяли в смеси, содержавшей 0,2 мл метанола (метанол 99 %, Sigma-Aldrich, США) и 1,4 мл хлороформа (хлороформ (ХЧ), «Химмед Синтез»), после чего в полученный раствор вносили 5 мкл этилдиизопропиламина (этилдиизопропиламин 98 %, Fluka, Голландия). После выпадения осадка полученный раствор отфильтровывали, осадок дважды промывали 1 мл хлороформа, а полученные прозрачные органические растворы объединяли. Объединенный раствор упаривали на роторном испарителе досуха, после чего к полученному сухому остатку добавляли 5,5 мл золь наночастиц магнетита. Конъюгацию проводили при непрерывном перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 16 ч при температуре 20 °С.

Оценка эффективности конъюгации наночастиц магнетита с доксорубицином

Эффективность конъюгации доксорубицина с наночастицами магнетита оценивали по интенсивности флуоресценции свободного доксорубицина в растворе с использованием спектрофлуориметра «Флюорат-02 Панорама» (Россия). Концентрацию доксорубицина измеряли по сигналу флуоресценции при 587 нм, возбуждаемому излучением с длиной волны 360 нм, с использованием предварительно построенных калибровочных кривых растворов доксорубицина в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-4} М. Для получения растворов, содержавших свободный доксорубин, аликвоту 0,2 мл конъюгированного золь наночастиц магнетита подвергали ультрацентрифугированию с использованием ультрацентрифуги Beckman Coulter Airfuge (США) со скоростью 95 000 об./мин в течение 30 мин. Для того чтобы убедиться в отсутствии наночастиц в супернатанте, применяли ядерно-магнитно-резонансную релаксометрию (ЯМР-релаксометрию). Было продемонстрировано, что значения времени релаксации T_1 и T_2 супернатанта (3,0 и 2,6 с) соответствовали таковым в дистиллированной воде. Полученную надосадочную жидкость раз-

бавляли в 30 раз дистиллированной водой, после чего для нее определяли интенсивность сигнала флуоресценции при 587 нм. Концентрацию доксорубина в исследуемой субстанции определяли как (модифицированный метод S. Nigam и соавт. [10]). Анализ доли конъюгированного доксорубина проводили на основе зависимости: $Dox_{кон} = Dox_{св} / Dox_{общ}$, где $Dox_{кон}$ — доля конъюгированного доксорубина, $Dox_{св}$ — доля свободного доксорубина, а $Dox_{общ}$ — общее количество доксорубина, введенное в систему.

Исследование антипролиферативной активности конъюгированных наночастиц магнетита

Антипролиферативную активность конъюгата наночастиц и доксорубина по сравнению с несвязанным доксорубином оценивали на культуре клеток HeLa (рак шейки матки человека). Клетки культуры HeLa, полученные из банка клеток Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения (Москва), инкубировали в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в среде DMEM (GIBCO, США) с 20 % термоинaktivированной эмбриональной телячьей сывороткой (SIGMA, США) с 2 mM L-глутамин («Панэко», Россия). Жизнеспособность и метаболическую активность опухолевых клеток оценивали методом теллурических токов (МТТ) [11], основанным на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразола (МТТ-реагента) до голубого кристаллического фармазана, который растворим в диметилсульфоксиде. Инкубацию клеточных культур с исследуемой субстанцией (наночастицы оксида железа, свободный доксорубин, доксорубин в составе конъюгата с наночастицами оксида железа) проводили в течение 48 ч в питательной среде в 96-луночном планшете. После этого в систему добавляли МТТ-реагент, с которым проводили инкубацию в течение 1,5 ч. Затем жидкую среду удаляли и вводили в лунки диметилсульфоксид. Анализ интенсивности окраски проводили спектрофотометрически планшетным сканером Униплан-2000 со светофильтром с длиной волны $\lambda = 530$ нм (PICON, Россия).

Изучение релаксационных свойств полученной субстанции

Измерение значений времени релаксации T_1 и T_2 проводили с помощью ЯМР-релаксометра Minispec mq20 с напряженностью магнитного поля 0,47 Тл (Bruker Optik GmbH, Германия) в дистиллированной воде. Релаксивность r_1 и r_2 (парамагнитную эффективность) определяли согласно соотношению:

$$1/T_{1,2} = 1/T_{1,2d} + r_{1,2} \times [Fe],$$

где $1/T_{1,2}$ — обратное значение времени продольной (1) и поперечной (2) релаксации протонов в измеряемой субстанции, $1/T_{1,2d}$ — обратное значение времени продольной (1) и поперечной (2) релаксации протонов в дистиллированной воде, $r_{1,2}$ — продольная (1) и поперечная (2) релаксивность измеряемой субстанции ($\text{mM}^{-1} \times \text{с}^{-1}$), $[Fe]$ — молярная концентрация железа (mM).

Исследование кинетики высвобождения доксорубина из конъюгата

Оценку кинетики высвобождения доксорубина из конъюгата проводили с помощью двухкамерной системы, разделенной диализной мембраной, с размером пор, соответствующим

3,5 кДа. Во внутреннюю камеру объемом 3 мл помещали исследуемый образец, а во внешнюю объемом 100 мл — натрий-фосфатный буфер (Amresco, США) при $\text{pH} = 7,4$ и температуре 20 °C. Для изучения влияния триггерного стимула (ультразвукового излучения) исследуемую систему подвергали ультразвуковому воздействию продолжительностью 15 мин с интервалом 2 ч 5 раз в день в течение первых 5 сут с помощью ультразвукового гомогенизатора (Cole Parmer (Sonics Material, США) 130 Вт, частота импульса 20 кГц). Титановый зонд размещали во внешней камере таким образом, чтобы обеспечить максимальную интенсивность акустической волны не более 3 Вт/см² (интенсивность подаваемой акустической волны рассчитывали, исходя из регулируемой мощности установки и площади рабочей поверхности). Через 1, 2, 6 и 10 сут из внешней камеры отбирали 3 мл образца, определяли в нем концентрацию свободного доксорубина по методике, описанной ранее, после чего образец возвращали во внешнюю камеру. На основе полученных таким способом данных строили кривую концентрации доксорубина во внешней камере.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета SPSS STATISTICA. Для значений размеров наночастиц, определенных методом электронной микроскопии, а также доли высвобожденного доксорубина определены средние и средние квадратичные отклонения, для значений дзета-потенциала, pH определены средние квадратичные отклонения. Размерная характеристика частиц, определенная методом динамического светорассеяния, охарактеризована средним взвешенным. Для вычисления значений релаксивности применен регрессионный анализ, а именно метод наименьших квадратов с вычислением коэффициента аргумента линейной функции типа $y = kx + b$. Для коэффициента аргумента определен доверительный интервал при уровне значимости 0,95. Сравнение выборочных коэффициентов аргумента для двух субстанций проводили по оценке пересечения доверительных интервалов. Достоверность отличия образцов в МТТ-анализе от контрольных образцов и друг от друга оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (исходя из предположения о нормальном распределении изучаемой переменной). Сначала оценивали достоверность отличия оптической плотности в экспериментальных лунках от контрольных лунок, затем рассчитывали долю выживших клеток в каждой ячейке планшета путем деления значений оптической плотности на среднее арифметическое значение оптической плотности контрольных образцов. Все полученные количественные результаты представлены в виде: $X = M \pm m$, где X — изучаемый показатель, M — его среднее значение в исследуемой статистической выборке, m — стандартное отклонение. Тем же способом рассчитывали 95 % доверительный интервал для МТТ-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обработка стабилизированного олеиновой кислотой золя наночастиц магнетита неионогенным ПАВ (Tween-80, полисорбат 80) приводила к существенному понижению дзета-потенциала поверхности наночастиц. Если в зольях, стабилизированных олеиновой кислотой, он составляет 32–38 мВ, то для этих же частиц, обработанных раствором Tween-80, снижается до –3–8 мВ. В целях изучения старения системы проанализированы данные для зольей, полученных 2 сутками (далее — новый золь) и 2 месяцами ранее (далее — старый золь): $-8,42 \pm 1,2$ мВ и $-3,26 \pm 0,45$ мВ соответственно.

Определение размеров синтезированных наночастиц оксида железа с доксорубицином с использованием просвечивающей электронной микроскопии показало, что в образце содержатся ассоциаты размером 25–30 нм, сформированные индивидуальными частицами размером менее 10 нм (рис. 1). Размерные характеристики наночастиц магнетита остаются практически неизменными в течение 2 мес (при температуре 20 °С в месте, недоступном для воздействия прямого солнечного света), в то время как размер ассоциатов за этот период увеличивается до 40–50 нм. Данные динамического лазерного светорассеяния дают аналогичный тренд (рис. 2). Методом рентгенофлуоресцентного анализа на основе калибровочных зависимостей, полученных с известной концентрацией искомого элемента, проведена оценка содержания железа в синтезированных золях. Она составила $0,54 \pm 0,03$ мг/мл. Эти данные необходимы не только для общего аттестационного профиля продукта синтеза, но и для оценки релаксационных свойств субстанции.

Полученные концентрационные кривые значений времен спин-решетчатой (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации (рис. 3) показали, что значения релаксивности золя биосовместимых наночастиц магнетита составили $r_1 = 10,57 \pm 2,0$, $r_2 = 93,83 \pm 2,6$ $\text{мМ}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, $r_1/r_2 = 0,11$. Эти же параметры для конъюгата наночастиц с доксорубицином составили $r_1 = 9,4 \pm 0,1$, $r_2 = 119,9 \pm 1,2$ $\text{мМ}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, а $r_1/r_2 = 0,08$. pH полученного золя составил $6,5 \pm 0,2$. Не отмечено значимых изменений параметров релаксации синтезированных наночастиц через 2 мес.

Выявлено статистически значимое (доверительные интервалы коэффициентов аргумента не пересекаются при уровне значимости 0,95) усиление эффективности ускорения процессов T_2 -релаксации после конъюгации наночастиц с доксорубицином, что может объясняться изменением размеров агрегатов наночастиц в результате функционализации по-

верхности наночастиц.

Метод флуоресцентного анализа использован для количественного определения доксорубицина в растворе. Исходная концентрация доксорубицина в водной среде, содержащей наночастицы магнетита, равна $9,4 \times 10^{-4}$ мМ. Аналогичный параметр в супернатанте, полученном после ультрацентрифугирования наночастиц магнетита, — $9,5 \times 10^{-5}$ мМ. Это дает основание заключить, что доля конъюгированного доксорубицина находится на уровне 90 %.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение дзета-потенциала поверхности наночастиц может свидетельствовать об эффективном повышении инертности (биосовместимости) наночастиц магнетита поверхностно-активным веществом.

Проведенный анализ стабильности золя имеет особое значение. Любой коллоидный раствор по определению должен рассматриваться как относительно нестабильная система, стремящаяся достичь более стабильного состояния с точки зрения присущей ей термодинамической энергии. В этой связи при рассмотрении золей как субстанции для дальнейшего биомедицинского применения следует уделить особое внимание их стабильности. Мониторинг публикаций показал, что, к сожалению, научные группы редко приводят детальные данные об анализе стабильности наночастиц оксида железа, синтезированных de novo в биомедицинских целях. Поскольку было обнаружено изменение свойств золя со временем с точки зрения размера наночастиц, необходимы дальнейшие исследования для оценки стабильности коллоидной системы как одной из важнейших характеристик субстанций, которые планируется использовать в перспективе для введения в человеческий организм.

Наночастицы оксида железа обладают более выраженным воздействием на спин-спиновое время релаксации, что определяет их как преимущественно T_2 -контрастные вещества. Механизм влияния на поперечную релаксацию определяется способностью наночастиц оксида железа создавать локальную магнитную неоднородность вблизи протонов воды, упрощая тем самым расфазировку магнитных спинов протонов. Отношение релаксивности r_1/r_2 у полученной субстанции (0,1) меньше, чем у Resovist и VSOP-C184 (r_1/r_2 0,14 и 0,42 соответственно) [12], что может рассматриваться как преимущество магнитных свойств синтезированного золя при его использовании для получения искусственно контрастированных T_2 -взвешенных изображений. Объяснить такое различие можно тем, что для получения Resovist и VSOP-C184 авторы использовали соответственно декстран и цитрат, которые отличаются более высокой гидрофильностью, чем система олеиновой кислоты и полисорбата 80, и, возможно, обеспечивают более высокую вероятность контакта молекул воды с поверхностью наночастиц оксида железа. Это облегчает спин-решетчатые энергетические процессы, что в свою очередь определяет более высокое значение T_1 , отражающееся на отношении r_1/r_2 .

Вместе с тем важно отметить, что размер кристаллического ядра наночастицы может вносить вклад в различия значений T_2 , в то время как немагнитная оболочка не влияет на процесс релаксации T_2 [13]. Это также может оказывать воздействие на изменение отношения r_1/r_2 .

В процессе синтеза наночастиц формируется структура «ядро-оболочка». Гидрофобные углеводородные радикалы олеиновой кислоты составляют внутренний, а гидрофильные полиоксиэтиленовые группы — внешний слой оболочки наночастиц магнетита (ядра). Предполагается, что гидрофобизированный (свободный от хлорид-иона) доксорубицин

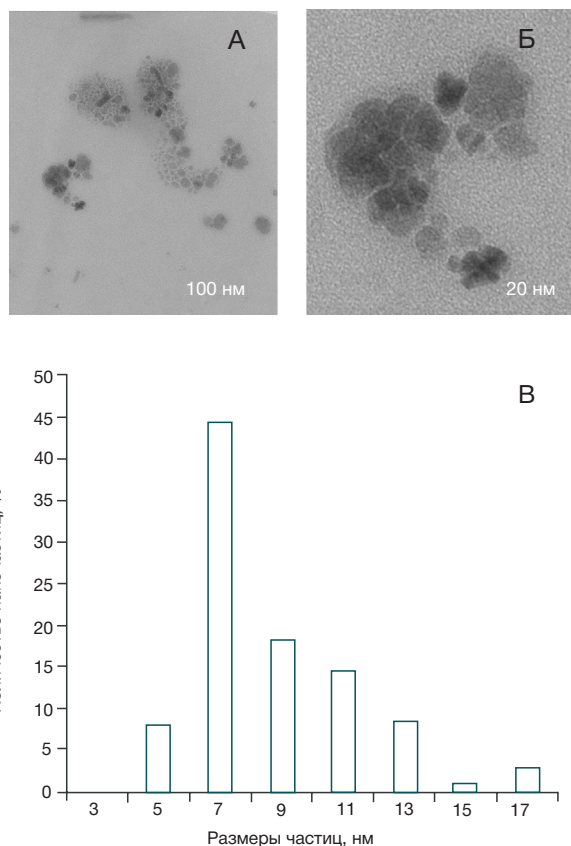


Рис. 1. Электронные микрофотографии наночастиц магнетита (А) и их ассоциатов (Б), гистограмма распределения наночастиц магнетита по размерам (В). Аттестация проведена через 2 сут после синтеза.

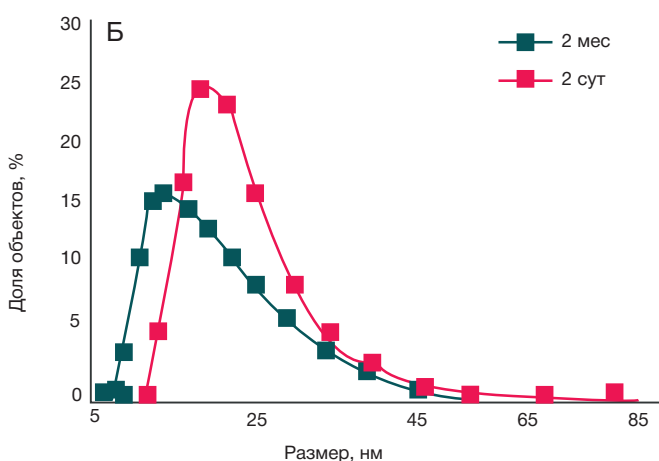
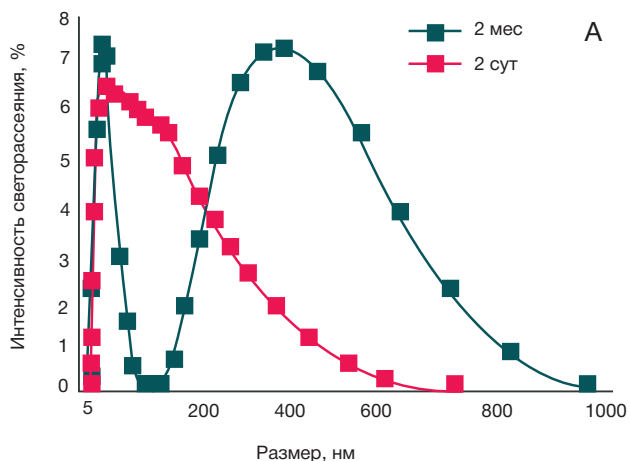


Рис. 2. Данные динамического лазерного светорассеяния золя магнетита через 2 сут и 2 мес после синтеза. (А) Результаты, полученные по интенсивности светорассеяния, (Б) результаты, полученные по числу объектов.

абсорбируется во внутреннем слое благодаря гидрофобным взаимодействиям углеводородных цепей олеиновой кислоты и тетраценовой ароматической структуры молекул доксорубина (рис. 4).

Немаловажным свойством синтезированных зелей наночастиц является их биосовместимость. Одно из необходимых условий ее достижения — удаление из реакционной массы неорганических катионов (NH_4^+) и анионов (Cl^- , SO_4^{2-}). В литературе описаны три основных подхода к очистке: магнитная декантация [7], осаждение избытком этанола с последующим центрифугированием [14], а также гель-фильтрационная хроматография [15]. Первый метод требует многократного повторения, что ведет к существенным потерям, второй вызывает разрушение коллоидной системы, а третий приводит к необратимому изменению химического состава поверхностного слоя. В этой связи для очистки золя от низкомолекулярных

с доксорубином обладают более выраженным цитостатическим эффектом ($p < 0,05$), чем доксорубин и наночастицы магнетита по отдельности. В таблице приведены значения полумаксимальных ингибирующих концентраций для свободных наночастиц Fe_3O_4 , наночастиц, конъюгированных с Dox, и их неконъюгированной смеси в сравнении со свободным доксорубином. Важно, что цитотоксичность увеличивалась в ряду Fe_3O_4 , Dox, $\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{Dox}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$, причем свободные наночастицы характеризуются сравнительно низкой цитотоксичностью и лишь в составе конъюгата статистически достоверно превышают цитотоксичность свободного доксорубина и смеси наночастиц с доксорубином.

Механизм обнаруженного феномена может быть отчасти связан с фармакологическим синергизмом цитостатических эффектов наночастиц и доксорубина в составе конъюгата. Известно, что цитотоксическое действие доксорубина

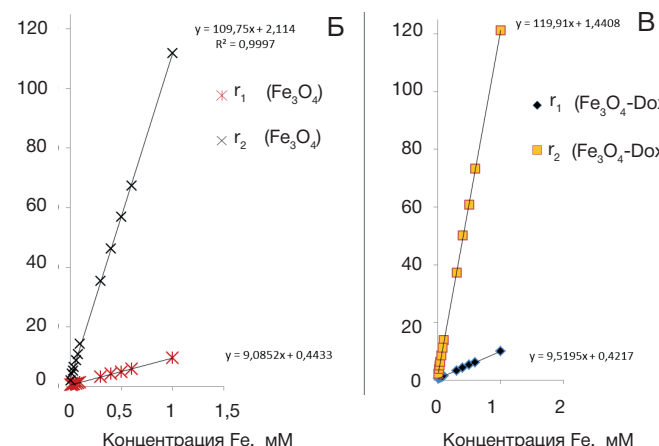
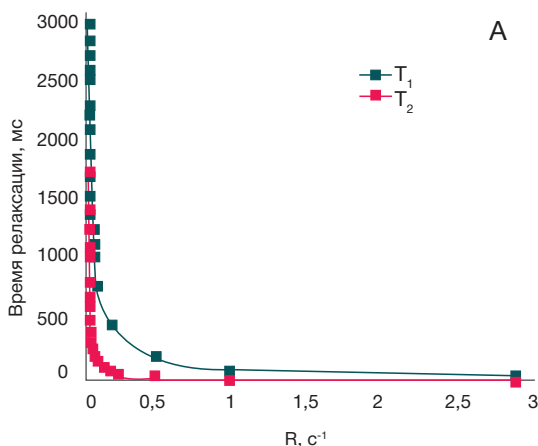


Рис. 3. (А) Концентрационные зависимости времени релаксации T_1 и T_2 ; (Б) концентрационные зависимости обратных значений спин-решетчатой ($r_1 = 1/T_1$) и спин-спиновой ($r_2 = 1/T_2$) релаксации золя наночастиц магнетита и (В) конъюгата наночастиц магнетита с доксорубином.

загрязнителей мы использовали метод диализа. Низкомолекулярные компоненты реакционной массы свободно проходят сквозь поры мембраны размером 3,5 кДа. В случае возникновения градиента концентраций компонента по разные стороны мембраны самопроизвольно происходит их выравнивание. Многократной заменой внешней жидкости на чистый растворитель (дистиллированную воду) можно добиться снижения концентрации неорганических соединений до фоновых значений.

При исследовании антипролиферативной активности доксорубина (Dox), наночастиц магнетита (Fe_3O_4) и конъюгата наночастиц магнетита с доксорубином ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$) в отношении клеток HeLa было показано, что конъюгаты наночастиц

Значения полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC_{50}) для образцов Fe_3O_4 , Dox, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$ и смеси Fe_3O_4 и Dox, полученные на культуре клеток HeLa

Состав образца	IC_{50} , М	95 % доверительный интервал IC_{50} , М
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$	$(7,4 \pm 0,09) \times 10^{-8}$ *	$5,5 \times 10^{-8}; 9,9 \times 10^{-8}$
$\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{Dox}$	$(3,7 \pm 0,08) \times 10^{-7}$ *	$3,2 \times 10^{-7}; 4,7 \times 10^{-7}$
Fe_3O_4	$(1,0 \pm 0,09) \times 10^{-6}$ *	$0,1 \times 10^{-6}; 1,8 \times 10^{-6}$
Dox	$(2,7 \pm 0,08) \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-7}; 3,0 \times 10^{-7}$

Примечание: * — статистически достоверное отличие выявлено при сравнении IC_{50} образца со значением IC_{50} Dox ($p < 0,05$). Значения IC_{50} сравнивали на основе концентраций доксорубина, кроме образца свободных наночастиц оксида железа (Fe_3O_4), для которого оценивали концентрацию железа.

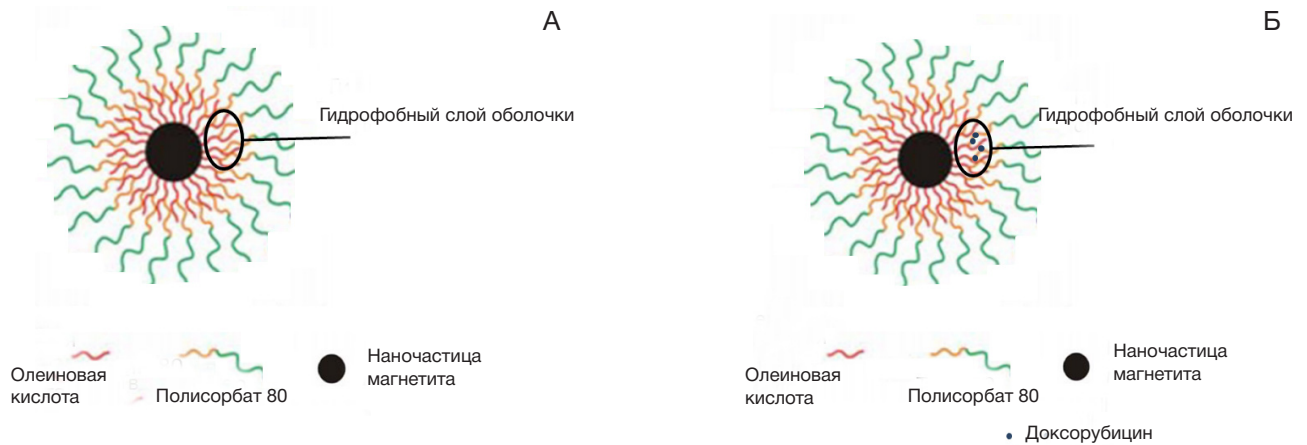


Рис. 4. (А) Строение наночастиц оксида железа, модифицированных олеиновой кислотой и стабилизированных полисорбатом 80, (Б) и тех же частиц, конъюгированных с молекулами доксорубицина (схема).

может усиливаться в составе комплекса с наночастицами оксида металла [16]. Вместе с тем весьма интересным объяснением наблюдаемого различия выживаемости клеточной культуры может быть облегчение интернализации доксорубицина в составе наночастиц оксида железа внутрь клетки и/или клеточных компартментов (например, внутрь клеточного ядра) без взаимодействия с системой выброса ксенобиотика. В пользу такого объяснения свидетельствует то, что конъюгат обладал значимо более высокой токсичностью по сравнению со смесью при схожих концентрациях наночастиц и доксорубицина. N. Schleich и соавт. [17] показали времязависимое накопление в клетках доксорубицина в составе конъюгата с наночастицами оксида железа. Наконец, возможно прямое ингибирование наночастицами системы выброса доксорубицина из клетки [18]. Эти гипотезы, выдвинутые на основе обнаруженного феномена и представленных в литературе данных, безусловно, требуют тщательной проверки.

С помощью диализа была изучена кинетика высвобождения доксорубицина из поверхностного слоя наночастиц. Кинетические исследования показали, что при pH = 7,4 установление равновесия между свободной и конъюгированной формами доксорубицина происходит в течение суток. Связывание доксорубицина в поверхностном слое наночастиц магнетита довольно прочное. Так, в течение 2–10 сут лишь 5 % конъюгированного доксорубицина оказывается во внешней жидкой среде и со временем, после 2 сут, не изменяется (рис. 5). Полученные данные позволяют говорить о принципиальной возможности отсроченного плавного высвобождения активной субстанции в ткани-мишени, что важно для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Дальнейшие исследования контролируемого высвобождения доксорубицина показали, что применение триггерного стимула (ультразвука) значительно повышало эффективность высвобождения молекул солюбилизованного вещества. Впервые ультразвуковое воздействие для повышения проникновения лекарственного вещества в ткань-мишень применили в 1950-х годах К. Феллингер (K. Fellinger) и Дж. Шмид (J. Schmid), которые таким образом улучшили биодоступность лечебной мази гидрокортизона по отношению к воспаленной ткани при лечении полиартрита [19]. Повышение высвобождения доксорубицина под действием ультразвука можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, часть распространяемой посредством ультразвуковой волны энергии поглощается объектом воздействия, что приводит к его локальному нагреву, а это в свою очередь способствует десорбции. Во-вторых, ультразвуковое излучение может приводить к кавитации, которая существенным образом ускоряет диффузию [20].

Представляет интерес продолжение экспериментов, касающихся применения ультразвука в адекватных режимах в условиях *in vivo*. Это позволит оценить наличие и выраженность эффекта «сонопорации» — временного улучшения проникновения полученных наноносителей в ткань- и клетку-мишень [20]. Требуется проведение дальнейшего поиска условий наилучшего высвобождения, включая изменение pH и применение других внешних триггерных импульсов.

Обнаруженный феномен позволяет говорить о возможности контролируемого высвобождения связанного гидрофобными связями доксорубицина при использовании ультразвука в качестве внешнего триггерного стимула. Преимуществами такого стимула являются неинвазивность ультразвукового излучения, а также потенциал локального воздействия с модификацией фармакокинетического профиля лекарственного вещества.

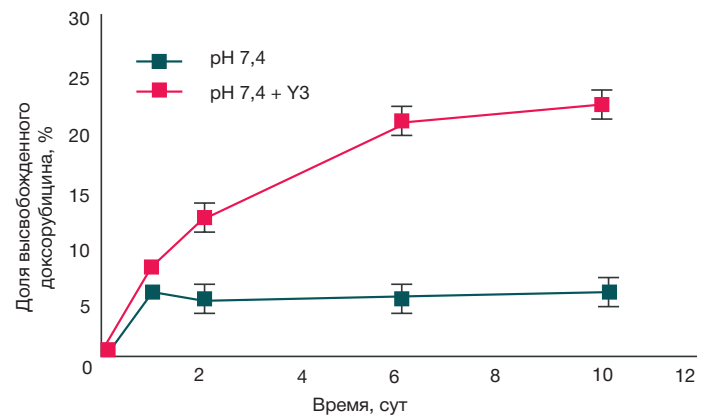


Рис. 5. Кинетика высвобождения доксорубицина из связи с наночастицами оксида железа в натрий-фосфатном буфере, pH = 7,4 (37 °C), без воздействия ультразвука и при дополнительном воздействии ультразвуком. Исходные концентрации железа и доксорубицина во внутренней камере системы: [Fe] = 9,7 mM, [Dox] = 0,94 mM.

ВЫВОДЫ

Полученная субстанция наночастиц оксида железа с доксорубицином может выполнять диагностическую (в сочетании с МРТ) и терапевтическую функции, что обеспечит дополнительные преимущества в условиях клинического применения, в частности позволит выявлять опухолевые очаги, проводить мониторинг биораспределения доксорубицина в режиме реального времени и оценивать ответ на химиотерапию.

Литература

1. Шимановский Н. Л. Направленный транспорт лекарственных веществ с помощью наночастиц оксида железа. Рос. хим. журн. 2012; LVI (3–4): 126–45.
2. Федотчева Т. А., Оленин А. Ю., Старостин К. М. и др. Перспективы применения наночастиц золота, серебра и оксида железа для повышения эффективности химиотерапии опухолевых новообразований. Хим.-фарм. журн. 2015; 49 (4): 11–22.
3. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF). *Kidney Int.* 2009; 75: 465–74.
4. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. *J Control Release.* 2011; 152: 76–83.
5. Ragab DM, Rohani S, Consta S. Controlled release of 5-fluorouracil and progesterone from magnetic nanoaggregates. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 3167–89.
6. Ling Y, Wei K, Zou F, Zhong S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *Int J Pharm.* 2012; 430: 266–75.
7. Jain KT, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhassetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm.* 2005; 2 (3): 194–205.
8. Beckhoff B, Kanngießer B, Langhoff N, Wedell R, Wolff H, editors. *Handbook of practical X-Ray fluorescence analysis.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.; 2006.
9. Yolles S, Aslund B, Morton J, Olson AT, Rosenberg B. Timed-released depot for anticancer agents. II. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15: 382–8.
10. Nigam S, Barick K, Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J Magn Magn Mater.* 2011; 323: 237–43.
11. Nogueira DR, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2011; 420 (1): 51–8.
12. Kaufels N, Korn R, Wagner S. Magnetic resonance imaging of liver metastases: experimental comparison of anionic and conventional superparamagnetic iron oxide particles with a hepatobiliary contrast medium during dynamic and uptake phases. *Invest Radiol.* 2008; 43 (7): 496–503.
13. Lawaczeck R, Menzel M, Pietsch H. Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Appl Organomet Chem.* 2004; 18: 506.
14. Yue-Jian C, Juan T, Fei X, Jia-Bi Z, Ning G, Yi-Hua Z, et al. Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010; 36 (10): 1235–44.
15. Hsieh WJ, Liang CJ, Chieh JJ, Wang SH, Lai IR, Chen JH, et al. In vivo tumor targeting and imaging with anti-vascular endothelial growth factor antibody-conjugated dextran-coated iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 2833–42.
16. Deng Y, Zhang H. The synergistic effect and mechanism of doxorubicin-ZnO nanocomplexes as a multimodal agent integrating diverse anticancer therapeutics. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 1835–41.
17. Schleich N, Sibret P, Danhier P, Ucakar B, Laurent S, Muller RN, et al. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Int J Pharm.* 2013; 447: 94–101.
18. Padwal P, Bandyopadhyaya R, Mehra S. Polyacrylic acid-coated iron oxide nanoparticles for targeting drug resistance in mycobacteria. *Langmuir.* 2014; 30 (50): 15266–76.
19. Ky Ng, Liu Y. Therapeutic ultrasound: Its application in drug delivery. *Med Res Rev.* 2002; 22 (2): 204–23.
20. Iwanaga K, Tominaga K, Yamamoto K, Habu M, Maeda H, Akifusa S, et al. Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14 (4): 354–63.

References

1. Shimanovskiy NL. Napravleniy transport lekarstvennykh veshchestv s pomoshch'yu nanochastits oksida zheleza. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal.* 2012; LVI (3–4): 126–45. Russian.
2. Fedotcheva TA, Olenin AYU, Starostin KM, et al. Perspektivy primeneniya nanochastits zolota, srebra i oksida zheleza dlya povysheniya effektivnosti khimioterapii opukholevykh novoobrazovaniy. *Khimiko-pharmatsevticheskiy zhurnal.* 2015; 49 (4): 11–22. Russian
3. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF). *Kidney Int.* 2009; 75: 465–74.
4. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. *J Control Release.* 2011; 152: 76–83.
5. Ragab DM, Rohani S, Consta S. Controlled release of 5-fluorouracil and progesterone from magnetic nanoaggregates. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 3167–89.
6. Ling Y, Wei K, Zou F, Zhong S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *Int J Pharm.* 2012; 430: 266–75.
7. Jain KT, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhassetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm.* 2005; 2 (3): 194–205.
8. Beckhoff B, Kanngießer B, Langhoff N, Wedell R, Wolff H, editors. *Handbook of practical X-Ray fluorescence analysis.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.; 2006.
9. Yolles S, Aslund B, Morton J, Olson AT, Rosenberg B. Timed-released depot for anticancer agents. II. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15: 382–8.
10. Nigam S, Barick K, Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J Magn Magn Mater.* 2011; 323: 237–43.
11. Nogueira DR, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2011; 420 (1): 51–8.
12. Kaufels N, Korn R, Wagner S. Magnetic resonance imaging of liver metastases: experimental comparison of anionic and conventional superparamagnetic iron oxide particles with a hepatobiliary contrast medium during dynamic and uptake phases. *Invest Radiol.* 2008; 43 (7): 496–503.
13. Lawaczeck R, Menzel M, Pietsch H. Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Appl Organomet Chem.* 2004; 18: 506.
14. Chen Y-J, Tao J, Xiong F et al. Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010; 36 (10): 1235–44.
15. Hsieh WJ, Liang CJ, Chieh JJ, Wang SH, Lai IR, Chen JH, et al. In vivo tumor targeting and imaging with anti-vascular endothelial growth factor antibody-conjugated dextran-coated iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 2833–42.
16. Deng Y, Zhang H. The synergistic effect and mechanism of doxorubicin-ZnO nanocomplexes as a multimodal agent integrating diverse anticancer therapeutics. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 1835–41.
17. Schleich N, Sibret P, Danhier P, Ucakar B, Laurent S, Muller RN, et al. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Int J Pharm.* 2013; 447: 94–101.
18. Padwal P, Bandyopadhyaya R, Mehra S. Polyacrylic acid-coated iron oxide nanoparticles for targeting drug resistance in mycobacteria. *Langmuir.* 2014; 30 (50): 15266–76.
19. Ky Ng, Liu Y. Therapeutic ultrasound: Its application in drug delivery. *Med Res Rev.* 2002; 22 (2): 204–23.
20. Iwanaga K, Tominaga K, Yamamoto K, Habu M, Maeda H, Akifusa S, et al. Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14 (4): 354–63.