

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА СФЕРИЧЕСКОЙ И КУБИЧЕСКОЙ ФОРМ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА В КЛЕТКИ ЛИНИИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ 4Т1

Т. Р. Низамов<sup>1</sup>✉, А. С. Гаранина<sup>1,2</sup>, В. И. Уварова<sup>1,2</sup>, В. А. Науменко<sup>1</sup>, И. В. Щетинин<sup>3</sup>, А. Г. Савченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория биомедицинских наноматериалов, Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

<sup>2</sup> Лаборатория тканеспецифических лигандов, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> Кафедра физического материаловедения, Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

Магнитные наночастицы (МНЧ) все больше привлекают внимание в качестве перспективного материала для разработки эффективных систем противоопухолевой терапии и диагностики. Целью работы было исследование влияния формы магнитного ядра наночастиц (НЧ) оксида железа на эффективность доставки доксорубицина в клетки линии 4Т1. Наночастицы сферической (СНЧ) и кубической (КНЧ) форм синтезировали методом термического разложения олеата железа (III), что позволило эффективно контролировать их форму и размер. Затем НЧ гидрофилизировали посредством использования Pluronic F-127. В полученные средства доставки загружали доксорубицин в среде натрий-фосфатного буфера. Загрузка составила 15,22% для СНЧ и 15,44% для КНЧ. IC<sub>50</sub> для незагруженного доксорубицина оказалась равной 1 мкМ, в то время как для СНЧ и КНЧ с препаратом — 6,4 мкМ и 5,5 мкМ соответственно. В протестированном диапазоне концентраций от 1,77 мг/л до 227,2 мг/л цитотоксичность у НЧ без препарата не выявлена. Согласно данным динамики накопления доксорубицина, в клетках 4Т1 активнее всего идет накопление свободного препарата — он локализуется в клеточном ядре. В то же время доксорубицин, загруженный в НЧ, накапливается менее интенсивно и первоначально локализуется в везикулах вокруг ядра, обнаруживаясь в самом ядре лишь после 2 ч совместной инкубации. Противоопухолевый препарат, загруженный в КНЧ, несколько более активно доставляется на ранних сроках инкубации с клетками по сравнению со СНЧ, однако данная разница не существенна.

**Ключевые слова:** наночастицы оксида железа, форма наночастиц, цитотоксичность, адресная доставка, доксорубицин

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 14.578.21.0201 (уникальный идентификатор RFMEFI57816X0201).

✉ **Для корреспонденции:** Тимур Радикович Низамов  
Ленинский пр-т, д. 4, г. Москва, 119049; nizamov.timur@gmail.com

**Статья получена:** 28.08.2018 **Статья принята к печати:** 20.09.2018

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2018.085

## THE USE OF IRON OXIDE MAGNETIC NANOSPHERES AND NANOCUBES FOR TARGETED DOXORUBICIN DELIVERY INTO 4T1 MOUSE BREAST CARCINOMA CELLS

Nizamov TR<sup>1</sup>✉, Garanina AS<sup>1,2</sup>, Uvarova VI<sup>1,2</sup>, Naumenko VA<sup>1</sup>, Schetinin IV<sup>3</sup>, Savchenko AG<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biomedical Nanomaterials, National University of Science and Technology MISIS, Moscow

<sup>2</sup> Laboratory of Tissue-Specific Ligands, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow

<sup>3</sup> Department of Physical Materials Science, National University of Science and Technology MISIS, Moscow

Magnetic nanoparticles (MNP) are attracting increasing attention as promising materials for the treatment and diagnosis of cancer. The aim of this work was to explore the effect of the magnetic core shape of iron oxide nanoparticles (NP) on the efficacy of doxorubicin delivery into 4T1 cells. Nanospheres (NS) and nanocubes (NC) were synthesized by thermal decomposition of iron (III) oleate. This method of synthesis enables control over the NP shape and size. The NP were hydrophilized using Pluronic F-127. The obtained particles were doped with doxorubicin in a sodium phosphate buffer. The weight fractions of doxorubicin in the NS and NC were 15.22% and 15.44%, respectively. The IC<sub>50</sub> of free doxorubicin was 1 μM. The IC<sub>50</sub> of doxorubicin-loaded NS and NC were 6.4 μM and 5.5 μM, respectively. Unloaded NP did not exhibit any toxicity towards the cells at a studied range of concentrations between 1.77 mg/l and 227.2 mg/l. Free doxorubicin demonstrated more vigorous accumulation dynamics in 4T1 cells with a tendency to localize in cell nucleus, whereas doxorubicin loaded onto iron oxide NP was mainly accumulated in the vesicles surrounding the nucleus and was able to enter it only after being incubated with the cells for 2 h. We conclude that doxorubicin loaded onto cubic-shaped NP is delivered into the cell nucleus a little bit more effectively at early incubation stages in comparison with nanospheres, but the difference is insignificant.

**Keywords:** iron oxide nanoparticles, nanoparticle shape, cytotoxicity, drug delivery, doxorubicin

**Funding:** this work was supported by the Project 14.578.21.0201 (ID RFMEFI57816X0201).

✉ **Correspondence should be addressed:** Timur R. Nizamov  
Leninsky prospect 4, Moscow, 119049; nizamov.timur@gmail.com

**Received:** 28.08.2018 **Accepted:** 20.09.2018

**DOI:** 10.24075/brsmu.2018.085

Магнитные наночастицы (МНЧ), и НЧ оксида железа в частности, в последнее время привлекают все больше внимания в качестве перспективного материала для разработки эффективных систем противоопухолевой терапии и диагностики. Это связано с тем, что современный уровень развития науки и технологий позволяет синтезировать МНЧ с заранее заданными функциональными свойствами, а также контролируемо химически модифицировать их поверхность для последующей адресной доставки лекарств и МРТ-диагностики [1–5]. Благодаря хорошим контрастным свойствам МНЧ средства доставки лекарств на их основе могут использоваться для исследования процессов распределения лекарственных препаратов в ткани-мишени в реальном времени, а также для оценки эффективности терапии [6]. Прочие средства доставки, такие как полимерные НЧ, липосомы, мицеллы и др., не проявляют контрастные свойства, что исключает их применение для исследования распределения *in vivo*. В то же время и у самих МНЧ есть целый ряд недостатков: токсичность, невысокая агрегационная стабильность и, как правило, низкая способность к образованию стабильных ковалентных связей с модификаторами поверхности. Для снижения токсичности и повышения агрегативной стабильности поверхность НЧ покрывают биосовместимой полимерной оболочкой. Применением такого подхода можно добиться высоких контрастных свойств наряду с хорошей агрегативной стабильностью, низкой токсичностью и возможностью иммобилизовать на поверхности этих НЧ необходимые компоненты: лиганды, лекарственные средства, векторы и др. Отдельно следует отметить новый перспективный метод получения средств доставки на основе МНЧ, в котором сначала НЧ оксида железа синтезируют методом термического разложения олеата железа (III) в присутствии стабилизатора (олеиновой кислоты) в среде, а затем выполняют фазовый перенос полученных НЧ в воду посредством Pluronic F-127 — блок-сополимера полиэтиленгликоля с полипропиленгликолем, обладающего поверхностно-активными свойствами. В образовавшейся полимерной оболочке присутствуют гидрофобные сайты, которые можно использовать для доставки гидрофобных лекарств [7–9].

Еще одним важным фактором, влияющим на взаимодействие средства доставки с биологическими системами наряду с химическим составом ядра и состоянием поверхности НЧ, является ее геометрия. Имеющиеся противоречивые данные по поглощению и цитотоксичности ряда наноматериалов показывают, что влияние формы НЧ на их поведение в живых организмах заранее предсказать трудно. Так, в одном исследовании было продемонстрировано большее повреждение ДНК углеродными нанотрубками по сравнению с менее токсичными НЧ сажи сферической формы на первичных фибробластах эмбриона мыши [10]. Авторы предположили, что данный эффект был вызван удлиненной формой нанотрубок с аспект-фактором (соотношением длины к ширине), равным 625. В другой работе наностержни оксида цинка с аспект-фактором 3 оказались менее токсичными, чем наносферы из того же материала, по отношению к клеткам остеосаркомы человека (MG-63) [11]. Еще в одной из работ был показан некоторый рост цитотоксичности и случаев захвата частиц клетками наряду с ростом аспект-фактора НЧ оксида кремния на клетках меланомы человека A375 [12]. Изучались также влияние формы НЧ серебра на рост дрожжей *S. cerevisiae* и интенсивность их захвата клетками [13]. Серебряные нанолисты оказались более

токсичными, чем наносферы, нанокубы и наностержни. Авторы предположили, что описанный эффект был обусловлен преобладанием на поверхности нанолистов химически более активных {111} граней, увеличивающих их цитостатическое воздействие на клетки дрожжей. В следующей работе у золотых наносфер — по сравнению с наностержнями золота — были выявлены более активное поглощение НЧ и высокая токсичность по отношению к эпителиальным клеткам MDCK II [14]. В то же время нет данных о влиянии формы МНЧ, в частности оксида железа, на клетки и адресную доставку лекарств.

Доксорубин является широко известным препаратом для лечения рака с антипролиферативным действием. Он активно используется в клинической практике уже более 40 лет. Однако его применение ограничено низкой селективностью и высокой токсичностью по отношению к неопухолевым клеткам организма. К примеру, наиболее опасными побочными эффектами препарата являются кардиомиопатия и сердечная недостаточность [15]. Таким образом, существует необходимость разработки новых средств доставки препарата, которые помогли бы устранить вышеописанные недостатки. Одним из решений данной проблемы может явиться использование средств доставки лекарств на основе уже упоминавшегося Pluronic F-127 [9]. Доксорубин способен адсорбироваться на поверхности НЧ, стабилизированных поверхностно-активными веществами, благодаря наличию у них гидрофобных сайтов и далее высвобождаться вследствие механического воздействия на МНЧ, вызванного броуновской релаксацией во внешнем магнитном поле или в кислой среде лизосом после захвата НЧ клетками [16].

В настоящей работе выполнено исследование влияния сферической и кубической форм НЧ оксида железа, модифицированных Pluronic F-127 и загруженных доксорубином, на взаимодействие с клетками линии 4Т1 (карцинома молочной железы мыши), а именно: цитотоксичность МНЧ, эффективность доставки лекарственного препарата в указанные опухолевые клетки и его распределение внутри них.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Pluronic F-127 (Sigma Aldrich; США), деионизированная вода, толуол, хч (Компонент-реактив; Россия), хлорид железа (III), 97% (Sigma Aldrich; США), олеиновая кислота, ≥99% (Roth; Германия), олеат натрия, 95% (Roth; Германия), соляная кислота, хч (СигмаТек; Россия), феррозин, ≥ 97% (Sigma Aldrich; США), ацетат аммония, ≥ 98% (Sigma Aldrich; США), аскорбиновая кислота, ≥99% (Sigma Aldrich; США), доксорубин гидрохлорид, ≥ 98% (Glentham; Великобритания), таблетки натрий-фосфатного буфера, Biotechnology Grade (Amresco; США), изопропанол, хч (СигмаТек; Россия), 1-октадецен, ≥ 95% (Sigma Aldrich; США), этанол, ≥ 95% (Sigma Aldrich; США), гексан, хч (СигмаТек; Россия), MTS (Promega; США), диметилсульфоксид, ≥ 99% (Sigma Aldrich; США), стандарт ICP по железу (Sigma Aldrich; США).

### Получение средств доставки лекарств и загрузка доксорубина

#### Получение сферических и кубических наночастиц

Сферические НЧ получали высокотемпературным термическим разложением олеата железа в соответствии

(с минимальными изменениями) с ранее описанным методом [17, 18]. 100 ммоль олеата натрия и 33 ммоль безводного хлорида железа (III) растворяли в смеси 66,7 мл этанола, 50 мл воды и 116 мл гексана при интенсивном перемешивании. Полученный раствор нагревали до 70 °С и продолжали перемешивание в этих условиях в течение 4 ч. Затем отделяли органическую фазу и выпаривали растворитель на роторном испарителе до получения коричневого воскоподобного комплекса олеата железа (III). 2,2 ммоль полученного олеата железа и 12 ммоль олеиновой кислоты растворяли в 10 мл 1-октадецена. Затем смесь нагревали до 320 °С в атмосфере аргона при интенсивном перемешивании. Скорость нагрева составляла 3,3 °С/мин. Систему выдерживали при температуре 320 °С 60 мин, после чего ее охлаждали до комнатной температуры и далее разбавляли в пять раз изопропанолом. Наночастицы собирали неодимовым магнитом и три раза промывали изопропанолом. Осадок редиспергировали в толуоле путем обработки ультразвуком.

Кубические НЧ синтезировали методом (с минимальными изменениями) высокотемпературного термического разложения олеата железа (III) [19]. 33 мл раствора, содержащего 4 ммоль комплекса олеата железа, 1,3 ммоль олеата натрия и 1,3 ммоль олеиновой кислоты, помещали в трехгорлую колбу с обратным холодильником на 100 мл. Далее систему грели при 140 °С в течение 60 мин для удаления следов воды, затем нагревали со скоростью 4 °С/мин до температуры кипения и выдержали при данной температуре в течение 30 мин. Все процедуры выполняли в атмосфере аргона. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и выделяли НЧ путем разбавления раствора 320 мл изопропанола и последующей магнитной декантации. Продукт трижды промывали изопропанолом и редиспергировали в толуоле.

#### Приготовление феррозинового теста

385,4 мг ацетата аммония, 3,2 мг феррозина и 352,2 мг аскорбиновой кислоты взвесили и растворили в 1 мл деионизированной воды. Полученный раствор в дальнейшем использовали для спектрофотометрического измерения концентрации железа.

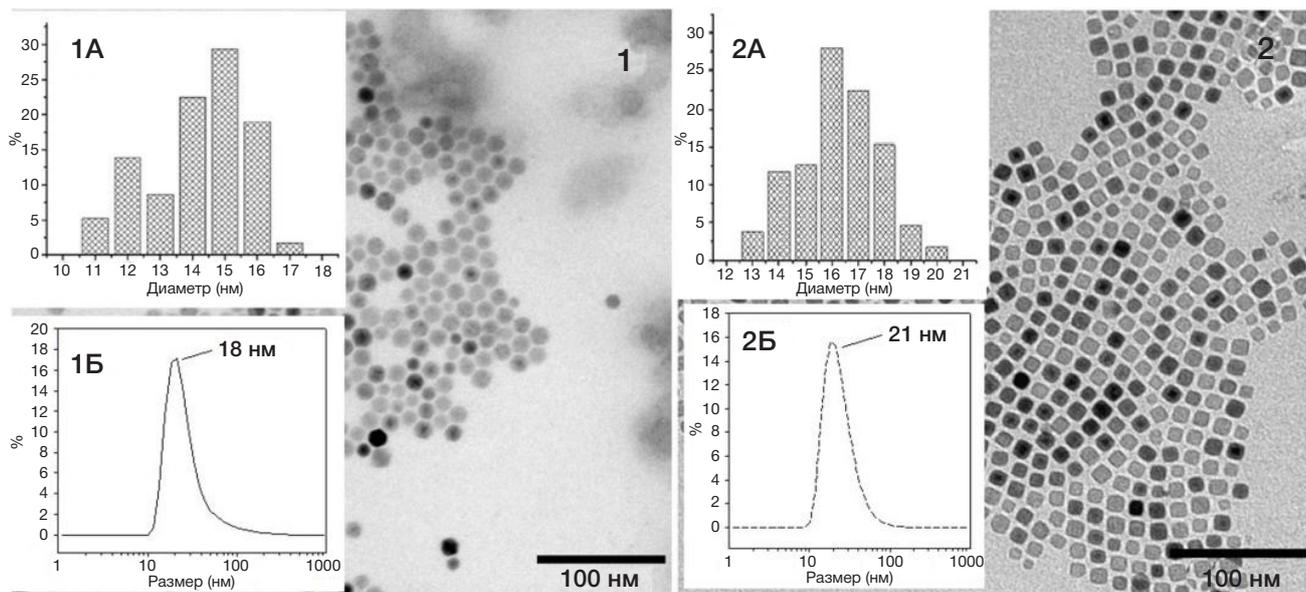


Рис. 1. Микрофотографии полученных образцов СНЧ (1) и КНЧ (2) оксида железа. Представлены также гистограммы распределения по размерам и их средний гидродинамический размер

#### Фазовый перенос наночастиц в воду с помощью Pluronic F-127

Фазовый перенос полученных НЧ оксида железа в воду выполняли с помощью неионного поверхностно-активного вещества Pluronic F-127 по описанной методике (с некоторыми изменениями) [20, 21]. 15 мл раствора НЧ в толуоле с концентрацией по оксиду железа 1 мг/мл смешивали с таким же объемом раствора Pluronic F-127 с концентрацией  $C = 25$  мг/мл в воде. Систему интенсивно перемешивали в течение ночи. Полученную эмульсию разделяли путем центрифугирования при малой скорости вращения (1000 г) и собирали водную фазу. Затем водную фазу снова центрифугировали при большой скорости вращения (12 000 г) для осаждения НЧ магнетита. Наконец, осадок повторно диспергировали в деионизированной воде при интенсивной обработке ультразвуком. Раствор разбавляли до  $C = 0,32$  мг/мл по оксиду железа.

#### Загрузка доксорубина в наночастицы оксида железа, покрытые Pluronic F-127

0,2 мл водного раствора доксорубина с концентрацией 5 мг/мл и 0,2 мл натрий-фосфатного буфера, концентрированного в пять раз относительно изотонического, с рН = 7,4, добавляли к 10 мл полученного водного раствора НЧ и перемешивали на магнитной мешалке в течение суток при комнатной температуре. Общая концентрация доксорубина в растворе с НЧ после добавления  $C_{\text{общ}}(\text{докс}) = 96,0$  мг/л. Затем раствор центрифугировали до осаждения всех НЧ. Собранные НЧ редиспергировали в натрий-фосфатном буфере при энергичном перемешивании на шейкере.

#### Определение характеристик полученных магнитных наночастиц

##### Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Морфологию и размер частиц оценивали с использованием 200 киловаттного просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100F (JEOL; Япония), ток 0,8 А.



его в новый планшет для предотвращения попадания в исследуемую смесь НЧ. Данные оптической плотности итогового раствора снимали на спектрофотометре при  $\lambda = 490$  нм. Построение гистограмм выживаемости клеток и вычисление величин стандартного отклонения проводили в программе Microsoft Office Excel 2007.

### Исследование динамики накопления свободного и загруженного в наночастицы доксорубицина в клетках

Клетки сажали на стекла в чашках Петри в концентрации 120–150 тыс./чашка. Через 24 ч в культуральную среду с клетками вносили свободный доксорубицин либо доксорубицин, загруженный в СНЧ или КНЧ, в концентрации 50 мкг/мл (по доксорубицину). В качестве контроля использовали клетки, инкубировавшиеся в среде. Через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч после со-культивирования с исследуемыми образцами клетки фиксировали 3,7% формалином в натрий-фосфатном буфере (рН 7,2–7,4; Gibco) в течение 15 мин. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS с объективом LplanFL RN2  $\times 60$  (Life technologies; США). Обработку полученных изображений и измерение интенсивности флуоресценции проводили в программе ImageJ 1.52a (Wayne Rasband (NIH); США). Для статистического анализа данных использовали однофакторный ANOVA-тест. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные методом термического разложения НЧ оксида железа исследовали с помощью ПЭМ (рис. 1). Согласно гистограмме распределения размеров, средний размер НЧ магнетита, полученных по методике для СНЧ, оказался равным 15 нм (рис. 1–1А). Синтезированные НЧ ожидаемо получились сферической формы. По данным измерения гидродинамического размера, средний размер СНЧ в толуоле составил около 18 нм (рис. 1–1Б).

Образцы, синтезированные по протоколу получения кубических НЧ, также охарактеризовали с использованием ПЭМ (рис. 1–2). В этом случае средний размер НЧ магнетита оказался равным 16 нм (рис. 1–2А). Синтезированные НЧ, как и ожидалось, оказались кубической формы. Средний

гидродинамический размер КНЧ составил около 21 нм (рис. 1–2Б).

По данным РСА, положение пиков и их интенсивность указывают на наличие у СНЧ структуры обратной шпинели, характерной для магнетита (рис. 2–1). Аналогичная структура и у КНЧ (рис. 2–2). Более полные данные указаны в таблице.

По данным измерения магнитных свойств полученных образцов, у СНЧ намагниченность насыщения  $M_s$  составила 50,5 э.м.е./г, а коэрцитивная сила  $H_c = 20,5$  Э (рис. 3–1). Сопоставимые магнитные свойства и у КНЧ: намагниченность насыщения — 60,5 э.м.е./г; коэрцитивная сила — 20,0 Э (рис. 3–2).

Средний гидродинамический диаметр НЧ после фазового переноса из толуола в воду с использованием Pluronic F-127 вырос до 43 нм для СНЧ (рис. 4–1) и до 50 нм для КНЧ (рис. 4–2), а дзета-потенциал для них соответственно составил  $-10$  мВ и  $-15,1$  мВ. После процедуры загрузки доксорубицина средний размер СНЧ составил около 68 нм (рис. 4–3), а дзета-потенциал стал положительным —  $+21,1$  мВ. Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае КНЧ: гидродинамический диаметр в среднем стал равным 78 нм (рис. 4–4), а дзета-потенциал —  $+22,0$  мВ. Расчет загрузки доксорубицина для СНЧ: концентрация препарата в супернатанте  $C_{ост}(докс)$  составила 40,7 мг/л, следовательно  $C_{зар}(докс) = C_{общ}(докс) - C_{ост}(докс) = 96,0 - 40,7 = 55,3$  мг/л. Тогда загрузка по массе  $\omega(СНЧ) = 100\% \cdot C_{зар}(докс) / (C_{зар}(докс) + C(НЧ)) = 100\% \cdot 55,3 / (55,3 + 308) = 15,22\%$ . Расчет загрузки доксорубицина для КНЧ:  $C_{ост}(докс) = 39,2$  мг/л, тогда  $C_{зар}(докс) = C_{общ}(докс) - C_{ост}(докс) = 96,0 - 39,2 = 56,2$  мг/л. В этом случае загрузка по массе  $\omega(КНЧ) = 100\% \cdot C_{зар}(докс) / (C_{зар}(докс) + C(НЧ)) = 100\% \cdot 56,2 / (56,2 + 308) = 15,44\%$  для КНЧ.

В ходе исследования выявили, что как СНЧ, так и КНЧ не оказывают токсического влияния на клетки линии 4Т1 во всем диапазоне тестируемых концентраций (рис. 5А). Инкубация клеток с аналогичными концентрациями СНЧ и КНЧ, загруженных доксорубицином, привела к снижению количества жизнеспособных клеток в популяции.  $IC_{50}$  (концентрация, при которой наблюдается 50% смертность клеток) для КНЧ с доксорубицином (КНЧ-Докс) составила 21 мг/л по оксиду железа и 5,5 мкМ по доксорубицину. Для СНЧ с доксорубицином (СНЧ-Докс) — 25 мг/л и 6,4 мкМ соответственно.  $IC_{50}$  чистого доксорубицина составила порядка 1 мкМ (рис. 5Б). Следовательно, загруженные

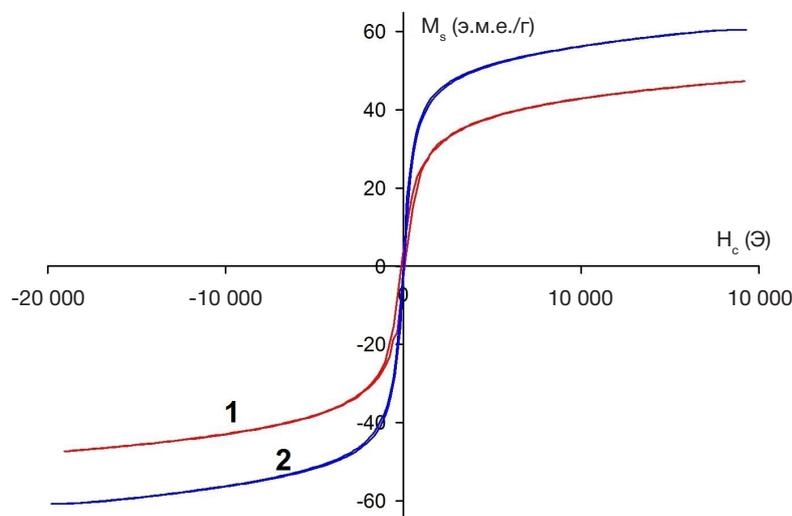


Рис. 3. Кривая намагничивания образцов СНЧ (1) и КНЧ (2)

доксорубицином КНЧ оказали несколько более выраженное противоопухолевое действие, чем СНЧ-Докс. Однако эта разница незначительна. Наибольшую гибель клеток вызвал свободный доксорубин.

Исследование динамики накопления свободного доксорубина в клетках, а также загруженного на КНЧ и СНЧ, выявило, что уже через 15 мин совместной инкубации в клетках обнаруживался небольшой сигнал флуоресценции доксорубина. Через 30 мин со-культивирования интенсивность флуоресценции свободного противоопухолевого препарата в клетках становилась сопоставима с таковой от доксорубина, доставленного в клетки посредством КНЧ. Однако свободный Докс накапливался преимущественно в ядрах клеток, в то время как доксорубин, загруженный на КНЧ, визуализировался в везикулах, располагающихся в околоядерной области (рис. 6А, Г, Л). Интенсивность флуоресценции в клетках доксорубина, доставленного с помощью СНЧ, была достоверно ниже, чем от КНЧ-Докс и Докс (рис. 6Ж). Данная тенденция сохранялась и после 45 мин совместной инкубации клеток линии 4Т1 со свободным и загруженным в НЧ противоопухолевым препаратом. Впоследствии интенсивность флуоресценции доксорубина, доставленного в клетки на КНЧ или СНЧ, существенно не отличалась. Однако накопление свободного доксорубина было значительно более выраженным, чем загруженного на НЧ. Стоит также отметить, что противоопухолевый препарат обнаруживался преимущественно в ядрах клеток только лишь после 2 ч совместной инкубации клеток с КНЧ-Докс и СНЧ-Докс. Таким образом, мы показали, что эффективность проникновения свободного доксорубина в клетки выше, чем препарата, загруженного в НЧ. Также было установлено, что КНЧ активнее проникают в клетки по сравнению со СНЧ. Однако впоследствии эта разница становится менее выраженной.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синтез МНЧ методом высокотемпературного разложения олеата железа (III) позволяет получать в препаративных количествах стабильные золи монодисперсных НЧ оксида железа контролируемых размера и формы: сферической [17, 18], кубической [19] и др. [22]. При этом исходный комплекс олеата железа (III) разлагается при высокой

температуре в процессе синтеза, а сам комплекс частично восстанавливается компонентами среды до Fe (II) с образованием НЧ оксида железа переменного состава между магнетитом ( $Fe_3O_4$ ) и маггемитом ( $\gamma-Fe_2O_3$ ). Оба оксида железа обладают ферромагнитными свойствами. Конечный размер и форма НЧ определяются наличием в реакционной среде стабилизаторов, таких как олеиновая кислота и олеат натрия. Они способны выборочно адсорбироваться на гранях {111} растущих НЧ и определять их конечную геометрию. Также из-за адсорбции этих стабилизаторов поверхность синтезированных НЧ оказывается гидрофобной, что является принципиально важным для последующего создания средств доставки гидрофобных лекарств, подобных доксорубину.

В ходе работы получены образцы кубической и сферической форм, стабилизированные Pluronic F-127 (рис. 1). Согласно результатам структурных (рис. 2) и магнитных исследований (рис. 3), данные образцы представляют собой оксид железа со структурой обратной шпинели. Из-за несоответствия размеров НЧ по данным ПЭМ с областью когерентного рассеяния (ОКР) можно сделать вывод, что образцы получились поликристаллическими (табл. 1). Коэрцитивная сила у обоих образцов  $>0$ , следовательно, они являются ферримагнетиками.

Полученные образцы стабильны как в гидрофобной среде (рис. 1–1Б, рис. 1–2Б), так и после фазового переноса в воду с Pluronic F-127 (рис. 4–1, рис. 4–2). Специфика этого процесса заключается в том, что в структуре данного полимера присутствует гидрофобный сайт полипропиленгликоля, благодаря которому он адсорбируется на гидрофобной поверхности НЧ, и два гидрофильных терминальных участка полиэтиленгликоля, которые оказываются расположенными «снаружи» после адсорбции. В итоге у НЧ после переноса в воду имеются гидрофобные сайты, куда можно загружать гидрофобные лекарственные препараты, и гидрофильная оболочка, существенно повышающая растворимость этих НЧ в водных средах. Увеличение гидродинамического размера НЧ в водном растворе также связано с этим процессом адсорбции стабилизатора.

Механизм загрузки доксорубина в полимерную оболочку НЧ состоит в том, что сам по себе препарат плохо растворяется в воде, поэтому обычно в клинической практике используют его гидрохлорид. Загрузку препарата проводят в среде натрий-фосфатного буфера, где происходит

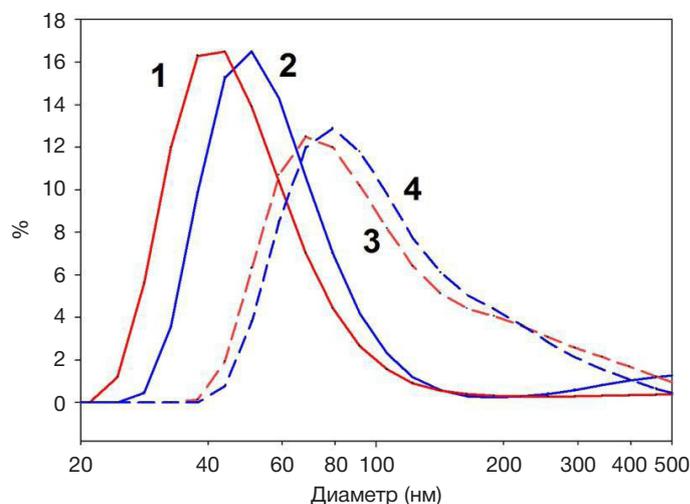


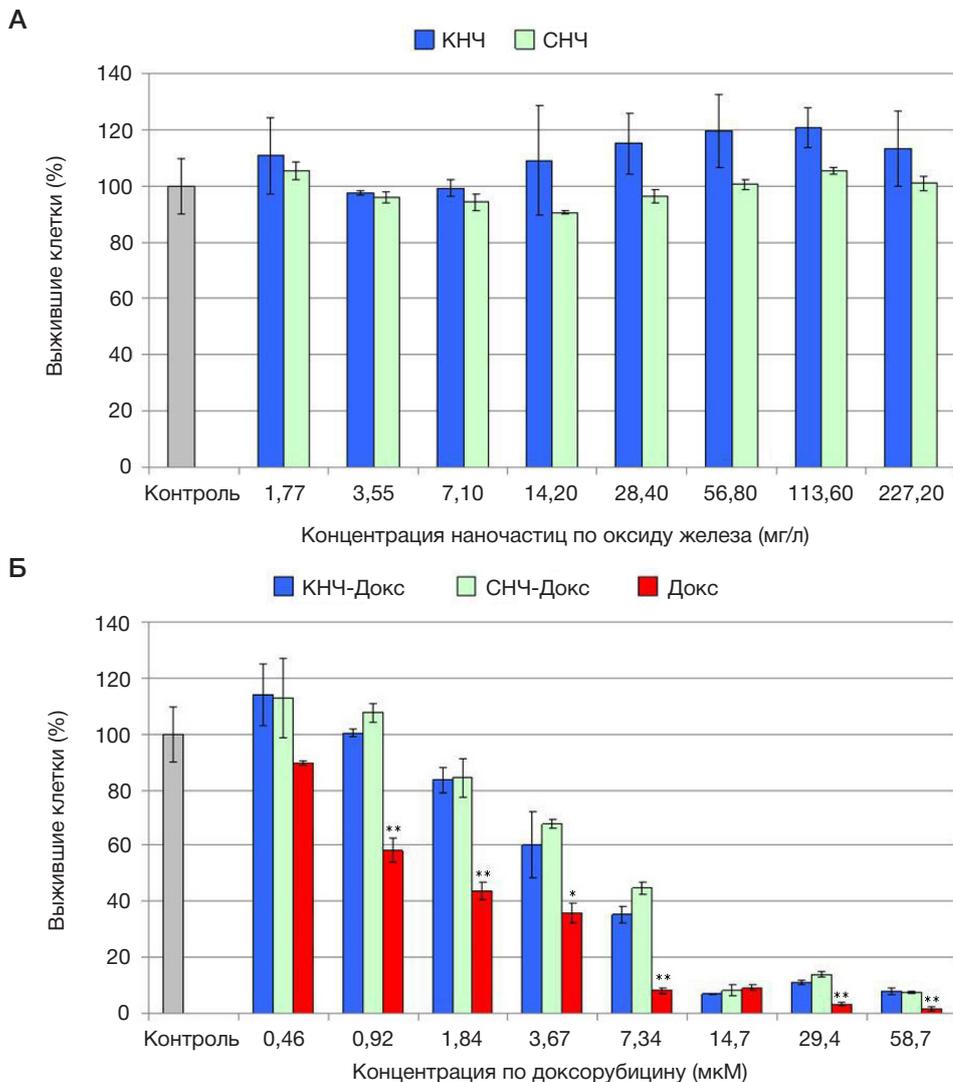
Рис. 4. Гидродинамический диаметр НЧ после фазового переноса в воду: СНЧ до (1) и после (3) загрузки доксорубицином; КНЧ до (2) и после (4) загрузки доксорубицином

депротонирование его молекулы, что приводит к образованию кристаллов его основания, малорастворимого в воде. Если же в такой среде присутствуют НЧ с гидрофобными сайтами, то депротонированный доксорубин может там адсорбироваться. По этой причине и наблюдается некоторое возрастание гидродинамического диаметра НЧ после загрузки, а также перезарядка их поверхности (рис. 4-3, рис. 4-4). В дальнейшем загруженный доксорубин может протонироваться в более кислой среде лизосом клеток (рН 4,5–5) и высвобождаться из полимерной оболочки НЧ [16].

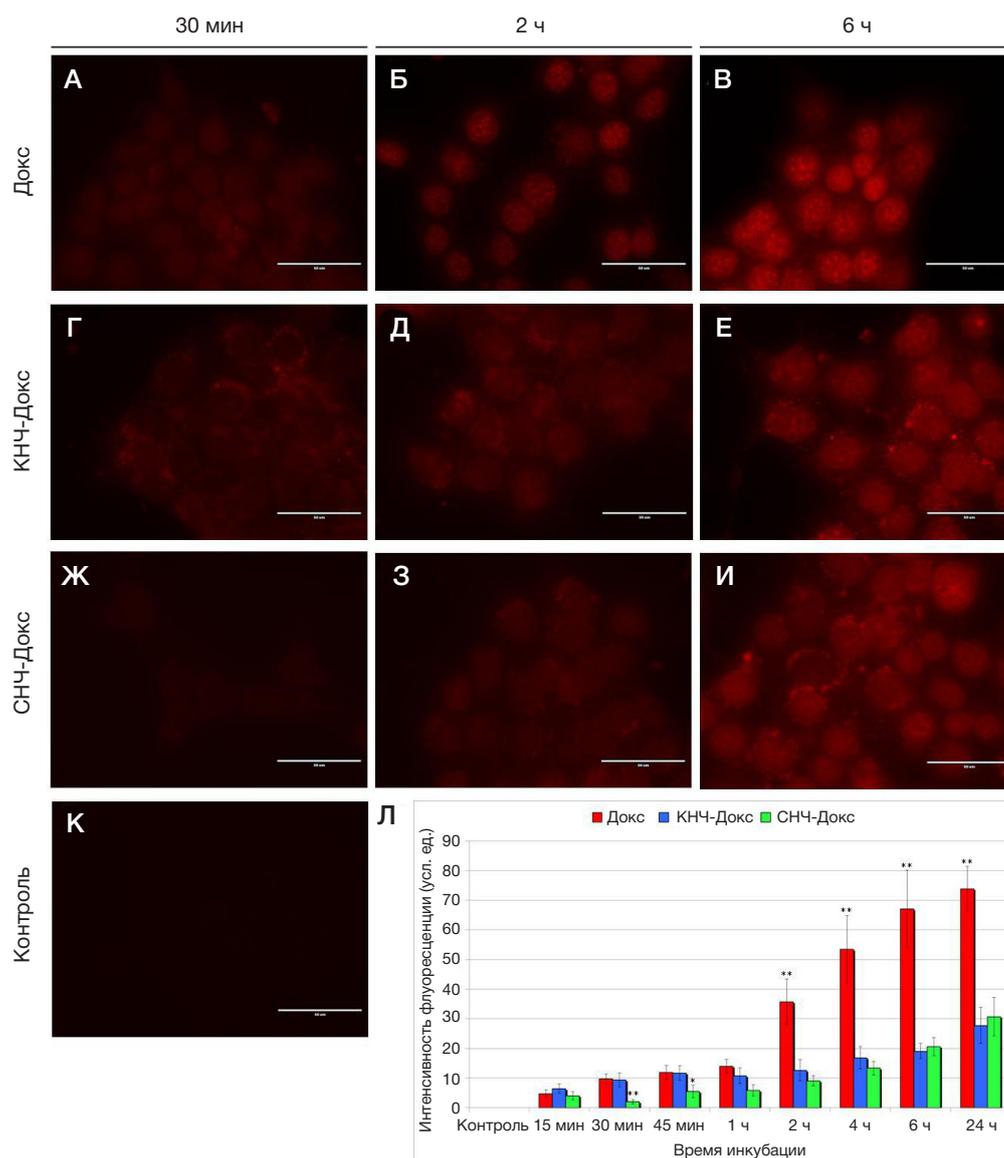
Вопрос влияния формы МНЧ на биологические системы актуален в связи с тем, что в последнее время появился ряд публикаций, в которых продемонстрированы преимущества несферических НЧ для гипертермии и МРТ-диагностики. Так, в ряде исследований показано [23, 24], что МНЧ кубической формы, а также «октоподы» [25] обладают большими значениями SAR по сравнению со сферическими МНЧ и поэтому могут найти применение в терапии посредством магнитной гипертермии. Кроме того, МНЧ кубической формы демонстрируют большие значения  $T_2$ -релаксивности по сравнению с аналогичными НЧ сферической формы [26]. В связи с этим мы провели сравнительный анализ влияния КНЧ и СНЧ на клетки, а также эффективности доставки противоопухолевого

препарата, загруженного на данные частицы, в клетки карциномы молочной железы мыши.

Выявлено, что в концентрациях вплоть до 227 мг/л синтезированные НЧ обеих форм не оказывают токсического влияния на клетки. Загруженные доксорубином КНЧ вызывают несколько более выраженную гибель опухолевых клеток по сравнению с СНЧ. Это может быть связано с тем, что КНЧ быстрее проникают в клетки, чем СНЧ. Однако данная разница незначительна. Свободный противоопухолевый препарат обладает значительно более выраженным цитотоксическим эффектом и активнее накапливается в ядрах клеток. Причиной этого может быть то, что свободный доксорубин проникает в клетки посредством диффузии, тогда как загруженный на НЧ лекарственный препарат попадает в клетки из-за эндоцитоза, что требует больше времени. Еще следует отметить, что НЧ, несущие доксорубин, сначала обнаруживаются в составе внутриклеточных везикул, предположительно лизосом, в которых впоследствии происходит протонирование лекарственного препарата. Только после этого он может высвобождаться из НЧ и транспортироваться в ядра клеток [27]. Таким образом, доксорубин, загруженный в НЧ, обладает меньшей противоопухолевой активностью, однако в дальнейшем,



**Рис. 5.** Оценка цитотоксичности НЧ на клетках линии 4T1. Гистограмма выживаемости клеток после 48 ч культивирования с КНЧ и СНЧ (А); после 48 ч сокультивирования с КНЧ-Докс, СНЧ-Докс и свободным доксорубином (Докс) (Б). MTS-тест. Результаты представлены как средние значения  $\pm$ SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Количество живых клеток, инкубированных с натрий-фосфатным буфером, был принят за 100%



**Рис. 6.** Динамика накопления свободного и загруженного на НЧ доксорубина в клетках линии 4Т1. Флуоресцентная микроскопия (А–К); гистограмма зависимости интенсивности флуоресценции доксорубина в клетках от продолжительности инкубации клеток с Докс, КНЧ-Докс и СНЧ-Докс (Л). Результаты представлены как средние значения  $\pm$ SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

после дополнительных модификаций (связывания специфических лигандов с поверхностью НЧ), такую систему можно использовать для адресной доставки противоопухолевого препарата [28].

## ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы выявлено, что эффективность доставки свободного доксорубина в опухолевые клетки линии 4Т1 выше, чем загруженного в СНЧ или КНЧ. В свободном виде препарат быстро проникает в клетку в результате диффузии и аккумулируется в клеточном ядре. В случае же загрузки в НЧ оксида железа он попадает в клетку путем эндоцитоза и аккумулируется

в везикулах, откуда уже постепенно высвобождается во внутриклеточную среду. Неполное высвобождение ведет к тому, что  $IC_{50}$  загруженного доксорубина существенно меньше, чем у свободного препарата. Несмотря на то что КНЧ показали несколько более эффективную доставку противоопухолевого препарата в клетки по сравнению с СНЧ, достоверного различия между ними не выявлено.

**Таблица.** Результаты рентгеноструктурных исследований образцов СНЧ и КНЧ

|     | Фаза             | ДПЭМ, нм | ОКР, нм   | Период решетки, нм  |
|-----|------------------|----------|-----------|---------------------|
| СНЧ | $Fe_3O_4$ (100%) | 11–17    | $6 \pm 1$ | $0,8373 \pm 0,0004$ |
| КНЧ | $Fe_3O_4$ (100%) | 13–20    | $6 \pm 1$ | $0,8378 \pm 0,0004$ |

## Литература

- Ling D, Hyeon T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. *Small*. 2013; 9 (9–10): 1450–66. DOI:10.1002/smll.201202111.
- Majewski P, Thierry B. Functionalized Magnetite Nanoparticles — Synthesis, Properties, and Bio-Applications. *Crit Rev Solid State Mater Sci*. 2007; 32 (3–4): 203–15. DOI:10.1080/10408430701776680.
- Xie J, Huang J, Li X, Sun S, Chen X. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. *Curr Med Chem*. 2009; 16 (10): 1278–94. DOI:10.2174/092986709787846604.
- Oh JK, Park JM. Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. *Prog Polym Sci*. 2011; 36 (1): 168–89. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2010.08.005.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem Rev*. 2008; 108 (6): 2064–110. DOI:10.1021/cr068445e.
- Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL et al. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials*. 2009; 30 (28): 5114–24. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.06.004.
- Andhariya N, Chudasama B, Mehta RV, Upadhyay RV. Biodegradable thermoresponsive polymeric magnetic nanoparticles: A new drug delivery platform for doxorubicin. *J Nanoparticle Res*. 2011; 13 (4): 1677–88. DOI:10.1007/s11051-010-9921-6.
- Tavano L, Vivacqua M, Carito V, Muzzalupo R, Caroleo MC, Nicoletta F. Doxorubicin loaded magneto-niosomes for targeted drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013; (102): 803–7. DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.09.019.
- Jain TK, Foy SP, Erokwu B, Dimitrijevic S, Flask CA, Labhassetwar V. Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomaterials*. 2009; 30 (35): 6748–56. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.08.042.
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol*. 2009; 29 (1): 69–78. DOI:10.1002/jat.1385.
- Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20 (1): 235–41. DOI:10.1007/s10856-008-3548-5.
- Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials*. 2010; 31 (3): 438–48. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.09.060.
- Xiong Y, Brunson M, Huh J, Huang A, Coster A, Wendt K et al. The role of surface chemistry on the toxicity of Ag nanoparticles. *Small*. 2013; 9 (15): 2628–38. DOI:10.1002/smll.201202476.
- Tarantola M, Pietuch A, Schneider D, Rother J, Sunnick E, Rosman C et al. Toxicity of gold-nanoparticles: Synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. *Nanotoxicology*. 2011; 5 (2): 254–68. DOI:10.3109/17435390.2010.528847.
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013; 65 (2): 157–70. DOI:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
- Gautier J, Munnier E, Paillard A, Hervé K, Douziech-Eyrolles L, Soucé M et al. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int J Pharm*. 2012; 423 (1): 16–25. DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.06.010.
- Yu WW, Falkner JC, Yavuz CT, Colvin VL. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem Commun*. 2004; (20): 2306–7. DOI:10.1039/b409601k.
- Park J, An K, Hwang Y, Park JG, Noh HJ, Kim JY et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater*. 2004; 3 (12): 891–5. DOI:10.1038/nmat1251.
- Hai HT, Yang HT, Kura H, Hasegawa D, Ogata Y, Takahashi M et al. Size control and characterization of wustite (core)/spinel (shell) nanocubes obtained by decomposition of iron oleate complex. *J Colloid Interface Sci*. 2010; 346 (1): 37–42. DOI:10.1016/j.jcis.2010.02.025.
- Simon T, Boca S, Biro D, Baldeck P, Astilean S. Gold-Pluronic core-shell nanoparticles: Synthesis, characterization and biological evaluation. *J Nanoparticle Res*. 2013; 15 (4): 1578. DOI:10.1007/s11051-013-1578-5.
- Gonzales M, Krishnan KM. Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications. *J Magn Magn Mater*. 2007; 311 (1): 59–62. DOI:10.1016/j.jmmm.2006.10.1150.
- Zhou Z, Zhu X, Wu D, Chen Q, Huang D, Sun C et al. Anisotropic shaped iron oxide nanostructures: Controlled synthesis and proton relaxation shortening effects. *Chem Mater*. 2015; 27 (9): 3505–15. DOI:10.1021/acs.chemmater.5b00944.
- Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, Marangon I, Guardia P, Silva AKA et al. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle "Deconstructors" of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano*. 2014; 8 (5): 4268–83. DOI:10.1021/nn405356r.
- Guardia P, Di Corato R, Lartigue L, Wilhelm C, Espinosa A, Garcia-Hernandez M et al. Water Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. *ACS nano*. 2012; 6 (4): 3080–91. DOI:10.1021/nn2048137.
- Nemati Z, Alonso J, Martinez LM, Khurshid H, Garaio E, Garcia JA et al. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects. *J Phys Chem C*. 2016; 120 (15): 8370–9. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b01426.
- Lee N, Kim H, Choi SH, Park M, Kim D, Kim H-C et al. Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108 (7): 2662–7. DOI:10.1073/pnas.1016409108.
- Nizamov TR, Garanina AS, Grebennikov IS, Zhironkina OA, Strelkova OS, Alieva IB et al. Effect of Iron Oxide Nanoparticle Shape on Doxorubicin Drug Delivery Toward LNCaP and PC-3 Cell Lines. *BioNanoScience*. 2018; 8 (1): 394–406. DOI:10.1007/s12668-018-0502-y.
- 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 (1): 76–83. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.01.024.

## References

- Ling D, Hyeon T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. *Small*. 2013; 9 (9–10): 1450–66. DOI:10.1002/smll.201202111.
- Majewski P, Thierry B. Functionalized Magnetite Nanoparticles — Synthesis, Properties, and Bio-Applications. *Crit Rev Solid State Mater Sci*. 2007; 32 (3–4): 203–15. DOI:10.1080/10408430701776680.
- Xie J, Huang J, Li X, Sun S, Chen X. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. *Curr Med Chem*. 2009; 16 (10): 1278–94. DOI:10.2174/092986709787846604.
- Oh JK, Park JM. Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. *Prog Polym Sci*. 2011; 36 (1): 168–89. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2010.08.005.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological

- applications. *Chem Rev.* 2008; 108 (6): 2064–110. DOI:10.1021/cr068445e.
6. Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL et al. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials.* 2009; 30 (28): 5114–24. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.06.004.
  7. Andhariya N, Chudasama B, Mehta RV, Upadhyay RV. Biodegradable thermoresponsive polymeric magnetic nanoparticles: A new drug delivery platform for doxorubicin. *J Nanoparticle Res.* 2011; 13 (4): 1677–88. DOI:10.1007/s11051-010-9921-6.
  8. Tavano L, Vivacqua M, Carito V, Muzzalupo R, Caroleo MC, Nicoletta F. Doxorubicin loaded magneto-niosomes for targeted drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013; (102): 803–7. DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.09.019.
  9. Jain TK, Foy SP, Erokwu B, Dimitrijevic S, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomaterials.* 2009; 30 (35): 6748–56. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.08.042.
  10. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol.* 2009; 29 (1): 69–78. DOI:10.1002/jat.1385.
  11. Nair S, Sasidharan A, Divya Rani W, Menon D, Nair S, Manzoor K et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2009; 20 (1): 235–41. DOI:10.1007/s10856-008-3548-5.
  12. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials.* 2010; 31 (3):438–48. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.09.060.
  13. Xiong Y, Brunson M, Huh J, Huang A, Coster A, Wendt K et al. The role of surface chemistry on the toxicity of Ag nanoparticles. *Small.* 2013; 9 (15): 2628–38. DOI:10.1002/sml.201202476.
  14. Tarantola M, Pietuch A, Schneider D, Rother J, Sunnick E, Rosman C et al. Toxicity of gold-nanoparticles: Synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. *Nanotoxicology.* 2011; 5 (2): 254–68. DOI:10.3109/17435390.2010.528847.
  15. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 2013; 65 (2): 157–70. DOI:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
  16. Gautier J, Munnier E, Paillard A, Hervé K, Douziech-Eyrolles L, Soucé M et al. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int J Pharm.* 2012; 423 (1): 16–25. DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.06.010.
  17. Yu WW, Falkner JC, Yavuz CT, Colvin VL. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem Commun.* 2004; (20): 2306–7. DOI:10.1039/b409601k.
  18. Park J, An K, Hwang Y, Park JG, Noh HJ, Kim JY et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater.* 2004; 3 (12): 891–5. DOI:10.1038/nmat1251.
  19. Hai HT, Yang HT, Kura H, Hasegawa D, Ogata Y, Takahashi M et al. Size control and characterization of wustite (core)/spinel (shell) nanocubes obtained by decomposition of iron oleate complex. *J Colloid Interface Sci.* 2010; 346 (1): 37–42. DOI:10.1016/j.jcis.2010.02.025.
  20. Simon T, Boca S, Biro D, Baldeck P, Astilean S. Gold-Pluronic core-shell nanoparticles: Synthesis, characterization and biological evaluation. *J Nanoparticle Res.* 2013; 15 (4): 1578. DOI:10.1007/s11051-013-1578-5.
  21. Gonzales M, Krishnan KM. Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications. *J Magn Magn Mater.* 2007; 311 (1): 59–62. DOI:10.1016/j.jmmm.2006.10.1150.
  22. Zhou Z, Zhu X, Wu D, Chen Q, Huang D, Sun C et al. Anisotropic shaped iron oxide nanostructures: Controlled synthesis and proton relaxation shortening effects. *Chem Mater.* 2015; 27 (9): 3505–15. DOI:10.1021/acs.chemmater.5b00944.
  23. Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, Marangon I, Guardia P, Silva AKA et al. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle "Deconstructors" of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano.* 2014; 8 (5): 4268–83. DOI:10.1021/nn405356r.
  24. Guardia P, Di Corato R, Lartigue L, Wilhelm C, Espinosa A, Garcia-Hernandez M et al. Water Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. *ACS nano.* 2012; 6 (4): 3080–91. DOI:10.1021/nn2048137.
  25. Nemati Z, Alonso J, Martinez LM, Khurshid H, Garaio E, Garcia JA et al. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects. *J Phys Chem C.* 2016; 120 (15): 8370–9. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b01426.
  26. Lee N, Kim H, Choi SH, Park M, Kim D, Kim H-C et al. Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108 (7): 2662–7. DOI:10.1073/pnas.1016409108.
  27. Nizamov TR, Garanina AS, Grebennikov IS, Zhironkina OA, Strelkova OS, Alieva IB et al. Effect of Iron Oxide Nanoparticle Shape on Doxorubicin Drug Delivery Toward LNCaP and PC-3 Cell Lines. *BioNanoScience.* 2018; 8 (1): 394–406. DOI:10.1007/s12668-018-0502-y.
  28. 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 (1): 76–83. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.01.024.