

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Ефремова Мария Владимировна

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

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

- Научные руководители** – *Клячко Наталья Львовна, доктор химических наук, профессор*
Мажуга Александр Георгиевич, доктор химических наук, профессор
- Официальные оппоненты** – *Ямсков Игорь Александрович, профессор, доктор химических наук, Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, заведующий лабораторией физиологически активных биополимеров*
Гроздова Ирина Дмитриевна, доктор биологических наук, кафедра высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник
Ярополов Александр Иванович, профессор, доктор химических наук, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, заведующий лабораторией химической энзимологии

Защита диссертации состоится «16» октября 2018 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/141341317/>

Автореферат разослан «13» сентября 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

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

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

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

Задачи работы:

1. Синтезировать гибридные НЧ магнетит-золото со структурой типа $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, варьируя размер и форму их магнитной составляющей;

2. Исследовать кристаллическую структуру и магнитные характеристики НЧ, а также их контрастные свойства в МРТ и тепловыделительные свойства в ГМЧ;

3. Модифицировать поверхность НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ стабилизирующими тиол-содержащими лигандами для иммобилизации фермента с возможностью дистанционного управления его каталитической активностью;

4. Функционализировать НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, варьируя характер взаимодействия лигандов с их поверхностью; в частности, одновременно ввести ковалентно связанную флуоресцентную метку и нековалентно ввести краситель/ лекарство в полимерную оболочку на НЧ с возможностью последующего высвобождения введенного вещества;

5. Провести комплексное исследование функциональных свойств наиболее перспективных НЧ *in vitro* и *in vivo* с целью создания платформы для тераностики.

Научная новизна:

Впервые систематически изучено влияние таких параметров, как размер и форма НЧ магнетита в составе гибридных НЧ магнетит-золото, на структуру и магнитные свойства последних в диапазоне размеров 6 – 44 нм.

В широком диапазоне размеров впервые исследована комбинация контрастных и тепловыделительных свойств гибридных НЧ магнетит-золото для МРТ и ГМЧ, а также установлена их корреляция со структурными и магнитными характеристиками. Верхняя граница полученных значений в 2-3 раза превышает соответствующие величины для коммерческих МРТ-контрастных агентов и гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, ранее описанных в литературе. Показано, что НЧ сохраняют эффективные контрастные и тепловыделительные свойства при тестировании *in vitro* на культуре клеток аденокарциномы молочной железы 4Т1 и индуцируют гибель клеток в условиях ГМЧ.

НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ впервые модифицированы рядом тиол-содержащих лигандов с варьируемой длиной углеводородной цепи и использованы для иммобилизации α -химотрипсина. Обнаружена возможность регуляции каталитической активности фермента под действием низкочастотного МП вплоть до ее снижения на 64% по сравнению с исходной вследствие механического влияния на конформацию фермента.

Впервые проведена как «одиночная», так и «двойная» функционализация НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$. При этом первая включает в себя только ковалентное связывание тиол-содержащего производного флуоресцентной метки Cy5 с поверхностью НЧ золота. Во втором типе функционализации оно дополнено нековалентной загрузкой в полимерную оболочку на НЧ магнетита красителя Nile Red, являющегося моделью гидрофобного лекарства, либо противоопухолевого препарата доксорубицина. Для НЧ, загруженных доксорубицином, продемонстрировано его рН-зависимое высвобождение *in vitro*, ведущее к дозозависимой цитотоксичности. При *in vivo* тестировании показано, что до 3% введенных НЧ накапливаются в опухоли в течение суток после внутривенного введения вследствие эффекта повышенной проницаемости и удержания. Продемонстрирована доставка загруженного на НЧ Nile Red в опухоль *in vivo*, где краситель высвобождается с поверхности НЧ.

Практическая значимость:

Полученные в данной работе НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ вследствие сочетания выраженных контрастных и тепловыделительных свойств могут быть использованы в качестве комбинированных контрастных агентов для МРТ-диагностики и ГМЧ. Обнаруженный в работе эффект низкочастотного МП на каталитическую активность α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$, открывает широкие перспективы для дистанционного управления биохимическими реакциями с участием иммобилизованных ферментов. «Двойная» химическая функциональность НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ и их способность к пассивному накоплению в опухолях позволяет говорить об эффективности изученных наноматериалов как платформы для тераностики и мультимодальной визуализации злокачественных новообразований.

На защиту выносятся следующие положения:

- Предложенные методы синтеза гибридных НЧ магнетит-золото со структурой типа «гантель» и «ядро-оболочка» позволяют получить наноструктуры различной формы в диапазоне размеров 6 – 44 нм с узким распределением по размерам.
- Физические свойства гибридных НЧ, являющиеся ключевыми с точки зрения применения в МРТ и ГМЧ, зависят от размера и морфологии НЧ и достигают оптимума для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ октаэдрической формы размером 25 нм.
- В системе НЧ типа «ядро-оболочка» с иммобилизованным на поверхности α -химотрипсином возможно дистанционное управление каталитической активностью фермента при помощи низкочастотного переменного МП.
- Поверхность НЧ магнетита и золота в составе гибридной структуры типа «гантель» может быть одновременно и селективно функционализирована двумя флуоресцентными красителями/ красителем и лекарством.
- Гибридные НЧ типа «гантель» могут быть использованы для доставки в опухоли молочной железы 4T1 *in vitro/ in vivo* и обеспечивают мультимодальную визуализацию методом МРТ и оптической спектроскопии, а также высвобождение загруженного препарата.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены автором на различных российских и международных конференциях, в том числе, Весенней встрече немецкого физического сообщества «DPG 2018» (Берлин, Германия), Международной конференции по наномедицине и нанобиотехнологиям «ICONAN 2017» (Барселона, Испания), Международной Балтийской конференции по магнетизму «IBCM 2017», Московском международном симпозиуме по магнетизму «MISM 2017» (Москва, Россия), Международных конференциях «Биокатализ: Основы и приложения» в 2015 и 2017 г (Истра, Россия), Российско-Греческом Симпозиуме с международным участием «Bionanotox-2017» (Ираклион, Крит, Греция), XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, Россия, 2017), IX международном форуме "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2017), II международной научной конференции «Наука

Будущего» (Казань, Россия, 2016), Международной конференции «Нанотехнологии в Медицине: От Молекул до Человека» (Хернштайн, Австрия, 2016).

Доклады автора на Международной Балтийской конференции по магнетизму «IVCM 2015» (Калининград, Россия), Российско-Греческом Симпозиуме с международным участием «Bionanotox-2016», Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018», «Ломоносов-2017» и «Ломоносов-2016» (Москва, Россия), I и II Международных научно-практических школах-конференциях «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение» (Звенигород, Россия, 2015 и 2017), а также на 29м семинаре им. Эдгара Люшера Немецкого научно-исследовательского сообщества в 2018 г (Клостерс, Швейцария) и X международном форуме "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2018) были признаны лучшими среди докладов молодых ученых. Доклад автора «Универсальная платформа для терапии и диагностики заболеваний предстательной железы на основе гибридных наночастиц магнетит-золото» на конкурсе студенческих научно-исследовательских проектов в рамках разработки концепции научно-технологической долины МГУ «Воробьевы Горы» (Москва, 2017), был признан лучшим в рамках секции «Биомедицина». Доклады автора признавались лучшими в рамках конкурсов на соискание премии имени И.В. Березина в области ферментативного катализа и биотехнологий (Москва, 2015, 2016, 2017).

Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных журналах, в том числе, ACS Nano, Scientific Reports, Angewandte Chemie International Edition и Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Часть результатов работы была получена в рамках грантов ФЦП №14.578.21.0201, Министерства образования и науки РФ № 11G34.31.0004, K2-2015-071, K2-2016-069, K3-2017-022 и K2-2018-008, РНФ № 14-13-00731, РФФИ № 17-54-33027и 18-33-01232.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 32 печатные работы: 12 статей в рецензируемых научных изданиях, 19 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций, 1 патент на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 144 страницах, содержит 16 таблиц и 43 рисунка. Список литературы включает 243 ссылки.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Синтез НЧ магнетит-золото с различным размером магнитной составляющей

В рамках оптимизации физических свойств гибридных материалов, а именно увеличения намагниченности насыщения и эффективной анизотропии для повышения R_2 -релаксивности в МРТ и SLP в ГМЧ, одной из задач работы являлось варьирование размера и формы магнитной компоненты (сферы/ кубы в диапазоне 5-50 нм).

В случае структур $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ только сферические НЧ Fe_3O_4 диаметром 9 ± 2 нм (образец 1) удалось покрыть золотой оболочкой согласно данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), в том числе высокого разрешения, а также энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX), показывающей совместное присутствие сигналов Fe (6,4 кэВ, К-линия) и Au (2,1 кэВ, L-линия) в спектре (рис. 1). Для этого использовались два метода – восстановление HAuCl_4 с помощью цитрата натрия при кипячении (образец 1А), либо с помощью гидрохлорида гидроксилamina при комнатной температуре (образец 1Б). Расчетная толщина оболочки Au в образце 1А составила 8 нм, в образце 1Б – 13 нм. При попытке покрытия золотой оболочкой НЧ Fe_3O_4 размером 15 – 41 нм была получена смесь отдельных НЧ Fe_3O_4 и Au, а спектры образцов после удаления непокрытых НЧ Fe_3O_4 не содержали сигнала Fe.

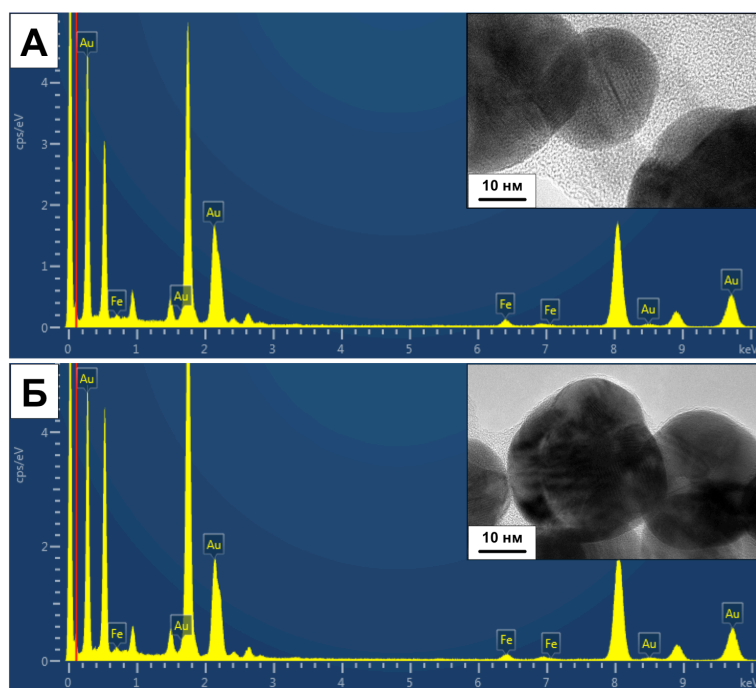


Рисунок 1. EDX-спектр, а также результаты ПЭМ высокого разрешения (врезка): А) образец 1А; Б) образец 1Б

В случае НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ была успешно получена серия образцов, в которой размер НЧ Fe_3O_4 увеличивался от 6 до 44 нм, а размер НЧ Au – с 3 до 11 нм (рис. 2). Все образцы синтезировали в атмосфере аргона путем термического разложения пентакарбонила железа на поверхности НЧ Au в высококипящих растворителях, варьируя температуру и время изотермической выдержки с последующим охлаждением до комнатной температуры и окислением на воздухе. При этом НЧ Au, используемые в качестве зародышей, были получены как *in situ* в процессе синтеза (образцы 5 и 6), так и отдельно

(образцы 7 и 8) с последующим добавлением в реакционную смесь. Важно отметить, что в состав НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, для получения которых использовались синтезированные *in situ* НЧ золота, входили сферические или слабо ограненные НЧ магнетита (рис. 2, А и Б), в то время как магнетит, выращенный на отдельно синтезированных зародышах золота, имел ярко выраженную октаэдрическую форму (рис. 2, В и Г). Гантелевидная структура образцов и отличие в контрастности входящих в их состав НЧ Fe_3O_4 и Au явно видны на ПЭМ-микрофотографиях.

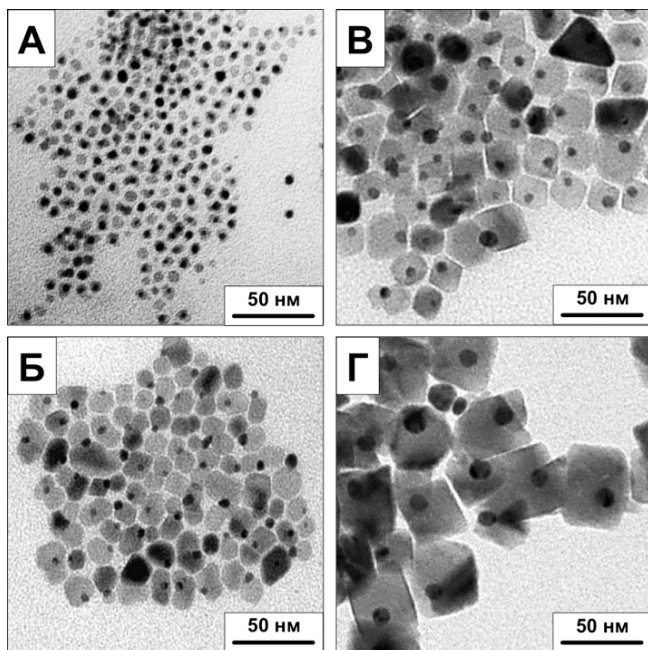


Рисунок 2. ПЭМ-микрофотографии НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$: (А) образец 5; (Б) образец 6; (В) образец 7; (Г) образец 8

2. Исследование и оптимизация физических свойств НЧ магнетит-золото

Структура и фазовый состав НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ были исследованы методом рентгенофазового анализа (РФА). Относительная интенсивность всех пиков, а также их положение на рентгенограммах для образцов 1А и 1Б соответствовали структуре Au, для образцов 5, 6, 7 и 8 – суперпозиции структур Fe_3O_4 и Au, согласно базе данных ICDD PDS. Отсутствие пиков Fe_3O_4 на рентгенограммах НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ согласуется с данными ряда статей, в которых упоминается об «эффекте тяжелых атомов» золота. В ряду образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ параметр решетки НЧ оксида железа увеличивался от 0,8376 нм для образца 5 до 0,8390 – 0,8394 нм для образцов 7 и 8. Можно сделать вывод, что по мере увеличения диаметра магнитных НЧ в составе «гантелей», их структура изменялась от промежуточной между маггемитом $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($a = 0,8346$ нм) и магнетитом Fe_3O_4 ($a = 0,8397$ нм) до объемного магнетита в случае октаэдрических НЧ диаметром 25 нм (образец 7). Для гантелевидных структур вышеупомянутый факт ранее не был описан в литературе. Наблюдалось также хорошее соответствие среднего размера кристаллитов по данным РФА и среднего диаметра НЧ по данным ПЭМ, что говорило об их монокристалличности. Согласно данным атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС), массовая доля Fe_3O_4 в НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ (образцы 1А и 1Б) была менее 10%, в то время как для всех образцов 5-7 НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ составляла около 85%.

Следующим этапом после исследования кристаллической структуры гибридных НЧ магнетит-золото стало изучение их магнитостатических свойств (рис. 3), включающее в себя петли гистерезиса и кривые охлаждения в нулевом МП и приложенном МП 5 мТл (ZFC/FC кривые). При комнатной температуре образцы 1, 1А, 1Б, 5 и 6 являются суперпарамагнитными, в то время как образцы 7 и 8 находятся в ферримагнитном состоянии. При низких температурах все образцы НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (5 – 8) обладают ненулевой коэрцитивной силой.

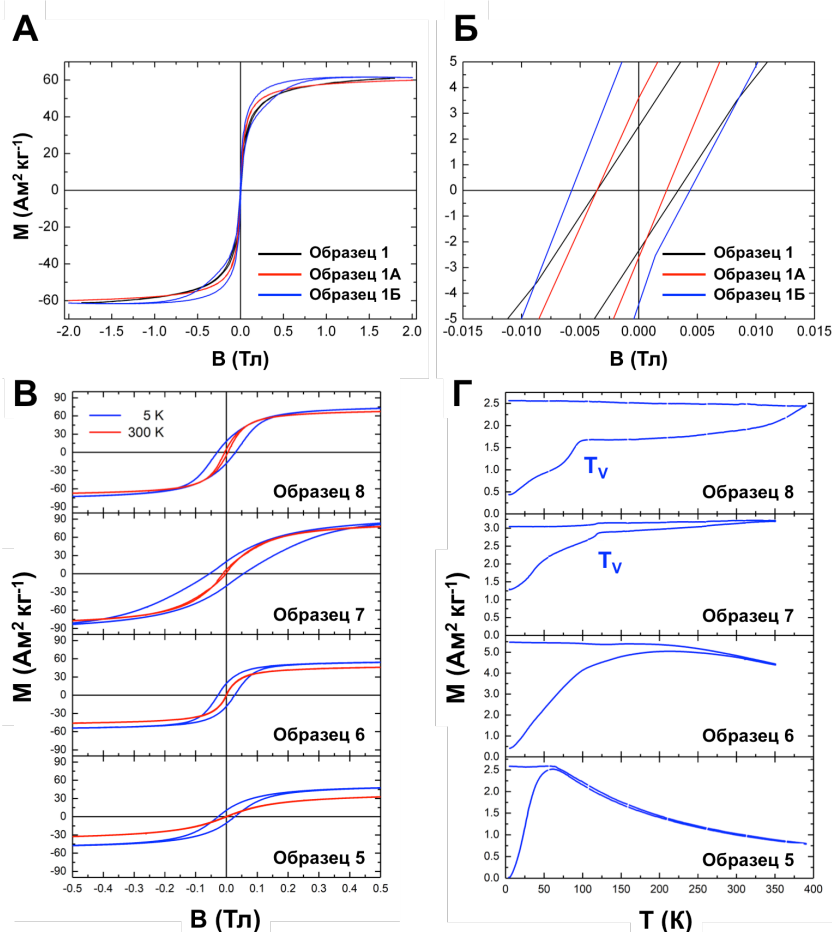


Рисунок 3. Магнитные свойства гибридных НЧ магнетит-золото: петли гистерезиса при $T = 300$ К для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ (А) и их увеличенные около нуля области (Б); петли гистерезиса при $T = 5$ и 300 К для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (В) и ZFC/FC кривые образцов в МП = 5 мТл (Г). T_V указывает температуру перехода Вервея для образцов 7 и 8

Намагниченность насыщения M_S НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ составляла $61\text{--}62 \text{ Ам}^2\cdot\text{кг} (\text{Fe}_3\text{O}_4)^{-1}$, что соответствует переходному состоянию между Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, в согласии с данными РФА. Для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ как при 5 К, так и 300 К M_S росла с увеличением размера НЧ: от $47,6 \text{ Ам}^2\cdot\text{кг} (\text{Fe}_3\text{O}_4)^{-1}$ для образца 5 до $86,8 \text{ Ам}^2\cdot\text{кг} (\text{Fe}_3\text{O}_4)^{-1}$ для образца 7 (при 300 К). В то же время, M_S образца 8 при 300 К достигала только $73,6 \text{ Ам}^2\cdot\text{кг} (\text{Fe}_3\text{O}_4)^{-1}$, вероятно, из-за уменьшения размеров кристаллитов и окисления поверхности НЧ до $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Важно отметить, что при 5 К значение M_S для образца 7 в пределах погрешности соответствовало величине для объемного материала. Для образцов 7 и 8 при 123 К и 100 К, соответственно, на ZFC-кривой наблюдался излом, связанный с переходом Вервея в Fe_3O_4 от моноклинной структуры при низких температурах к кубической структуре шпинели при высоких температурах. В объемном материале данный переход происходит при $T_V = 123$ К, что в точности соответствовало T_V для образца 7, свидетельствуя о высоком качестве структуры кристаллов Fe_3O_4 .

Таким образом, несмотря на выраженные магнитные свойства НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, содержание Fe_3O_4 в такой структуре низкое, что ограничивает диапазон достижимых концентраций в растворе, а доступной для дальнейшей функционализации является только золотая оболочка. В связи с этим наиболее перспективным для рассмотрения применением было выбрано исследование характеристик образцов в *in vitro* МРТ, а также магнито-механическом управлении активностью ферментов, которые можно иммобилизовать на поверхности НЧ за счет ковалентной связи с золотой оболочкой.

Структура и магнитные свойства НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ были впервые оптимизированы в широком диапазоне размеров НЧ оксида железа. При этом с увеличением размера НЧ их свойства изменялись от переходных между Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ до выраженных характеристик стехиометричного Fe_3O_4 (образец 7). Это дает основание полагать, что перспективным будет исследование свойств образцов в *in vitro* МРТ и ГМЧ как функции размера НЧ. Кроме того, «двойная» химическая функциональность НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ с учетом возможности селективной модификации поверхностей Fe_3O_4 и Au является актуальной для дальнейшего рассмотрения в тераностике и мультимодальной визуализации.

3. Оптимизация химических свойств НЧ магнетит-золото для биомедицины

Структуры «ядро-оболочка» ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$). Одним из наиболее перспективных вариантов функционализации золотой оболочки НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ является использование тиол-содержащих соединений, образующих прочную связь Au-S с энергией 40 ккал/моль. Для изучения магнито-механической регуляции активности ферментов НЧ были покрыты L-цистеином, 3-меркаптопропионовой кислотой (3-МПК), липоевой кислотой, 11-меркаптоундекановой кислотой (11-МУК) и тиол-ПЭГ-кислотой, структурные формулы которых изображены на рисунке 4. Маркировка образцов НЧ, а также их гидродинамический диаметр D_{HD} и ζ -потенциал, определенные методом динамического светорассеяния (DLS), приведены в таблице 1.

Таблица 1. Маркировка и физико-химические характеристики образцов функционализированных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, полученных в работе

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

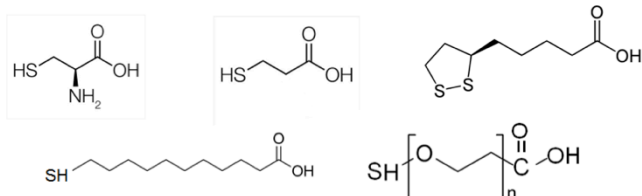


Рисунок 4. Лиганды, использовавшиеся для функционализации НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (слева направо): L-цистеин, 3-МПК, липовая кислота, 11-МУК, тиол-ПЭГ-кислота

Структуры «гантель» ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$). Для исследования характеристик в МРТ и ГМЧ, НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ были переведены в водную фазу путем покрытия биосовместимым полимером 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N- [карбокси (полиэтиленгликолем) -5000] (DSPE-ПЭГ-COOH), которое представляет собой производное полиэтиленгликоля и фосфолипида (рис. 5, А). По данным DLS, полученные НЧ с полимерной оболочкой обладали D_{HD} от 120 до 250 нм. За счет наличия карбоксильных групп на поверхности НЧ, все образцы обладали отрицательным ζ -потенциалом = (-20) – (-30) мВ.

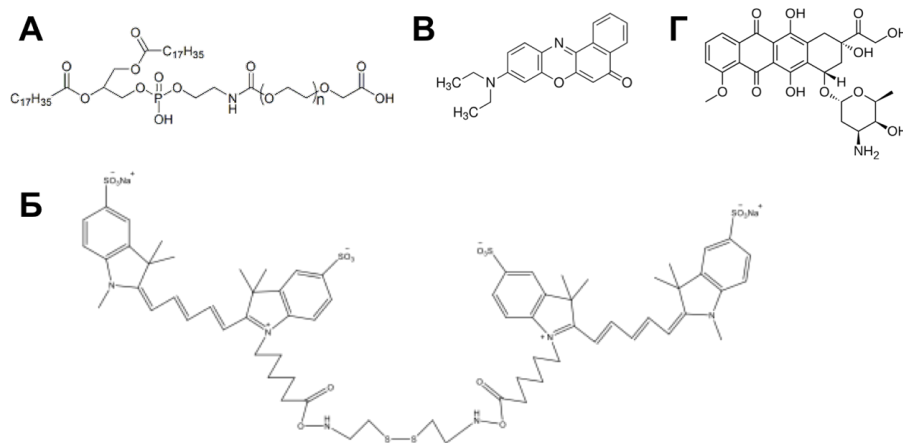


Рисунок 5. Лиганды, использовавшиеся для функционализации НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$: А) DSPE-ПЭГ-COOH; Б) краситель Sulfo-Cy5 с S-S связью; В) краситель Nile Red; Г) препарат DOX

Для дальнейшего применения в тераностике и/или мультимодальной визуализации был выбран образец 7, стабилизированный DSPE-ПЭГ-COOH (далее – НЧ-PEG). Общая концепция и схема функционализации представлена на рисунке 6.

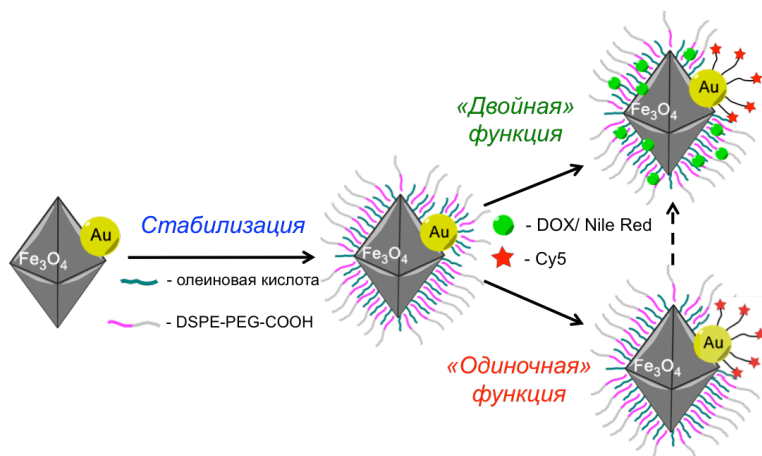


Рисунок 6. Схематичное изображение стабилизации НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ при помощи DSPE-ПЭГ-COOH, а также «одиночной» функционализации НЧ Au производным Cy5 и «двойной» – при загрузке DOX/ Nile Red в полимерную оболочку на НЧ Fe_3O_4

Так называемая «одионочная» функционализация была основана на присоединении флуоресцентного красителя Sulfo-Cy5, содержащего S-S фрагмент (рис. 5, Б), к поверхности НЧ Au с образованием связи Au-S и вытеснением олеиновой кислоты, а также связанного с НЧ Au полимера. В этой системе (НЧ-Cy5) НЧ Fe₃O₄ были покрыты DSPE-ПЭГ-COOH и служили для общей стабилизации. «Двойная» функционализация включала в себя, помимо модификации НЧ Au производным Cy5, нековалентное связывание второго флуоресцентного красителя Nile Red (NRed-НЧ-Cy5) или противоопухолевого препарата доксорубина DOX (DOX-НЧ-Cy5) в полимерную оболочку на НЧ Fe₃O₄. Как DOX, так и Nile Red за счет наличия гидрофобных участков (рис. 5, В и Г) взаимодействовали с фосфолипидной частью DSPE-ПЭГ-COOH, обеспечивая загрузку.

Эффективность связывания с НЧ-Cy5 второго красителя (в случае NRed-НЧ-Cy5) или лекарства (в случае DOX-НЧ-Cy5) оценивалась с помощью спектроскопии поглощения в видимом диапазоне. Для всех флуоресцентно меченых НЧ наблюдался характерный пик поглощения Cy5 (≈ 640 нм, загрузка 33 мкг Cy5 на 1000 мкг Fe₃O₄/154 мкг Au) с появлением пика Nile Red (≈ 539 нм) и DOX (≈ 480 нм) для NRed-НЧ-Cy5 и DOX-НЧ-Cy5 (загрузка 86 мкг Nile Red или 285 мкг DOX на 1000 мкг Fe₃O₄).

Биосовместимость НЧ *in vitro* исследовали с помощью MTS-теста на клеточной культуре аденокарциномы молочной железы мыши 4T1. Все исследуемые НЧ, диспергированные в фосфатно-солевом буфере PBS (pH 7,4) не оказывали токсического влияния на клетки, при этом образцы достоверно не отличались друг от друга, и во всех случаях уровень выживаемости клеток составлял более 90% по сравнению с контролем.

4. Функциональные свойства НЧ магнетит-золото в МРТ и ГМЧ

Контрастирующая способность НЧ в МРТ оценивалась путем измерения зависимости обратного времени T₂-релаксации от концентрации Fe на так называемых фантомных изображениях. Полученную зависимость аппроксимировали линейной функцией и вычисляли тангенс угла наклона, соответствующий R₂-релаксивности. Было установлено, что как НЧ Fe₃O₄@Au (образцы М-5 и М-6, покрытые тиол-ПЭГ-кислотой), так и НЧ Fe₃O₄-Au (образцы 5, 6, 7 и 8, стабилизированные DSPE-ПЭГ-COOH) уменьшают время T₂-релаксации протонов воды (рис. 7). Для образцов 1А и 1Б были получены величины R₂-релаксивности = 226 и 193 мМ⁻¹·с⁻¹, соответственно (рис. 7, А).

Для НЧ Fe₃O₄-Au был обнаружен рост R₂-релаксивности от 159 до 495 мМ⁻¹·с⁻¹ (в воде, рис. 7, Б) и от 118 до 612 мМ⁻¹·с⁻¹ (в имитирующей среду внутри клеток агарозе, рис. 7, В) в ряду образцов 5 – 7, соответственно. Дальнейшее увеличение размера до 44 нм в образце 8 не привело к значительному повышению значения R₂ (514 и 620 мМ⁻¹·с⁻¹ для НЧ в воде и агарозе, соответственно). Данный факт можно объяснить начальным ростом намагниченности насыщения M_s при увеличении НЧ Fe₃O₄ вплоть до размера 25 нм, при котором достигается значение M_s объемного материала, сохраняющееся и для НЧ диаметром 44 нм. Следует отметить, что величина R₂-релаксивности для образцов 7 и 8 не только выше по сравнению с коммерческими контрастными агентами Resovist® (R₂ =

150 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) и Feridex® ($R_2 = 120 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), но и по сравнению с НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, ранее описанными в литературе ($R_2 = 245 - 381 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Наиболее вероятными причинами исключительной контрастирующей способности НЧ является высокая упорядоченность их кристаллической структуры, которая приводит к магнитным свойствам объемного материала, создающего сильное МП, а также ограниченности НЧ, создающих высокие градиенты МП вблизи 6 вершин и 8 ребер октаэдров. Более того, значения R_2 образцов 6-8 в агарозе становятся еще выше по сравнению с водными растворами (рис. 7, Г). То есть, можно ожидать эффективное МРТ-контрастирование с помощью НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ также и в *in vitro* / *in vivo* экспериментах.

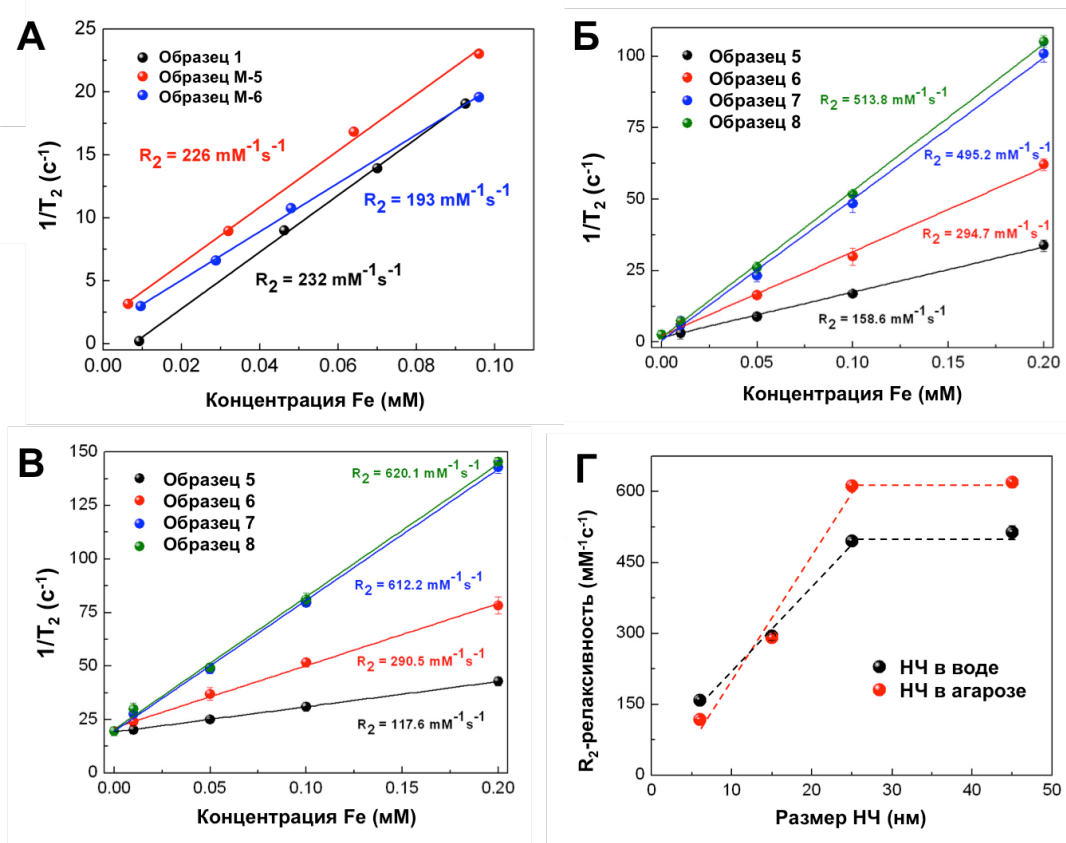


Рисунок 7. Функциональные свойства НЧ в МРТ. Зависимость обратного времени T_2 -релаксации протонов воды от концентрации Fe для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в воде (А); для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в воде (Б) и 2% агарозе (В); зависимость R_2 -релаксивности от размера НЧ в воде и агарозе (Г)

Для изучения тепловыделительных характеристик в ГМЧ были выбраны НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, позволяющие достичь высоких концентраций Fe в растворе (1-10 $\text{мг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Эффективность нагрева НЧ в модельных системах определялась в переменном МП частотой 765 кГц и амплитудой 30 мТл для образцов 5, 6, 7 и 8, стабилизированных DSPE-ПЭГ-СООН в различных концентрациях в воде и 2% агарозе (рис. 8).

На рисунке 8, А изображены две кривые нагрева (при включении МП) и охлаждения (при отключении МП) для водных растворов образцов 5 и 7, соответственно. Суперпарамагнитные НЧ Fe_3O_4 диаметром 6 нм (образец 5) не вызывали нагрев до рабочих температур ГМЧ (41-45°C, заштрихованная полоса). В то же время,

ферритмагнитные НЧ Fe_3O_4 размером 25 нм достигали 42°C в течение первых 35 с приложения МП. Аналогичные кривые для образцов НЧ в агарозе показаны на рисунке 8, Б. Для образцов 5 и 6 были получены низкие (менее $80 \text{ Вт}\cdot\text{г}^{-1}$) значения SLP, что недостаточно для эффективной ГМЧ; однако, SLP образцов 7 и 8 была значительно выше (более $327 \text{ Вт}\cdot\text{г}^{-1}$, рис. 8, В и Г). Как и в случае с релаксивностью, наблюдаемая зависимость может быть объяснена переходом от суперпарамагнитного к ферритмагнитному состоянию в диапазоне размеров 15 – 25 нм, сопровождающемуся ростом намагниченности насыщения M_S с увеличением диаметра НЧ.

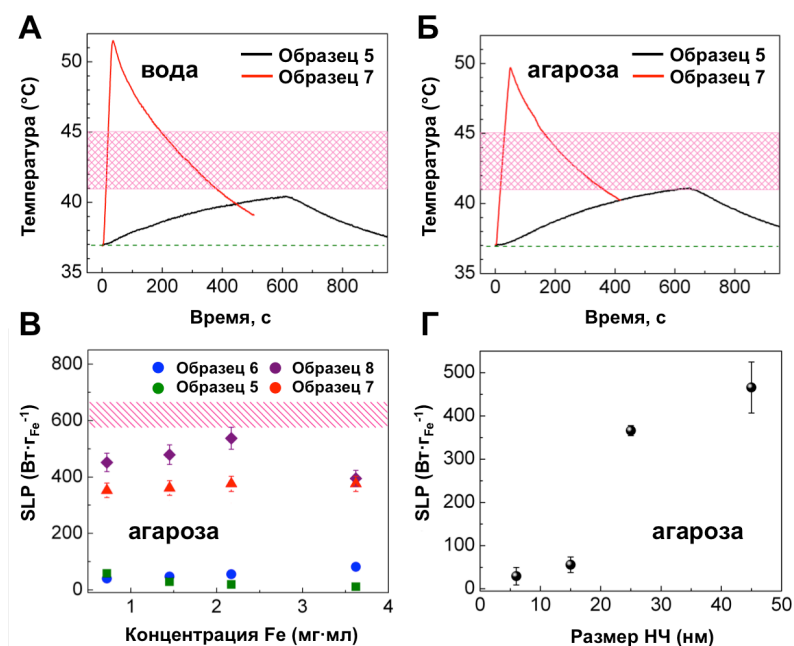


Рисунок 8. ГМЧ для НЧ Fe_3O_4 -Au. Кривые нагрева образцов 5 и 7 в воде (А) и агарозе (Б), заштрихованная область показывает температуры $41\text{--}45^\circ\text{C}$; значения SLP для образцов 5, 6, 7 и 8 в агарозе по сравнению со значением в воде для образца 7, (заштрихованная область) (В); сравнение значений SLP для НЧ различного размера (Г).

В качестве эталона скорость нагрева и соответствующая ей SLP измерялись для образца 7 в водном растворе, SLP ($617 \pm 44 \text{ Вт}\cdot\text{г}^{-1}$) обозначена заштрихованной полосой (рис. 8, В). На рисунке 8, Г представлена зависимость значения SLP от размера магнитной компоненты НЧ Fe_3O_4 -Au. Резкое отличие в SLP между образцами 6 и 7 объясняется переходом от суперпарамагнитного состояния к термически заблокированному ферритмагнитному. При этом заключение НЧ в матрицу агарозы, сопоставимую по вязкости с внутриклеточной средой, приводит к почти двукратному уменьшению SLP для образца 7, вследствие подавления Брауновской релаксации НЧ в МП. Несмотря на это, в целом ферритмагнитные НЧ Fe_3O_4 -Au обеспечивают высокие по сравнению с литературой значения SLP для ГМЧ как в воде, так и в агарозе.

Образец 7 был выбран для дальнейшего изучения *in vitro* на клетках 4T1. В МРТ для него была получена R_2 -релаксивность $276,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; то есть, контрастирующая способность НЧ в клеточной культуре несколько снижается, однако по-прежнему остается высокой по сравнению с аналогичными данными в литературе и коммерческими контрастными агентами. В ГМЧ образец 7 добавляли к клеткам 4T1, после чего подвергали воздействию МП частотой 261–393 кГц и амплитудой 25 мТл в течение 15 или 30 мин.

Обнаружено, что воздействие МП в течение 15 мин не вызывало значительного снижения выживаемости в культуре 4T1 (гибель $22 \pm 1\%$ клеток, MTS-тест) по сравнению с клетками, инкубированными при 37°C с или без НЧ в отсутствие МП. Данные MTS-теста подтверждались также исследованием апоптоза/ некроза: положительное окрашивание клеток 4T1 обнаруживалось только на периферии клеточного монослоя. Кроме того, после 15 мин воздействия МП наблюдалась активация АФК, что было подтверждено увеличением числа H2DCFDA-положительных клеток в культуре. Важно, что 30 мин воздействия МП уже достаточно для гибели $79 \pm 8\%$ клеток (MTS-тест). В соответствии с этим обнаруживалась более выраженная активация апоптоза/ некроза и генерация АФК. В дополнительном эксперименте культуру 4T1 предварительно выдерживали с НЧ в течение 6 ч до воздействия МП с целью усиления взаимодействия НЧ с клетками. В этом случае как 15, так и 30 мин воздействия МП приводили к активации апоптоза/ некроза в 100% исследуемых клеток по сравнению с контролем без МП.

5. Магнито-механическое управление активностью ферментов с помощью НЧ магнетит-золото

НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ являются оптимальными носителями для ковалентной иммобилизации ферментов, благодаря их стабильности и функциональным свойствам поверхности. В настоящее время активно изучается влияние механических эффектов на активность подобных биомакромолекул, и актуальной проблемой является возможность дистанционного воздействия, которую потенциально предоставляет переменное МП.

Таким образом, НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ изучались с целью магнито-механического управления активностью модельного фермента α -химотрипсина. Для его иммобилизации на НЧ использовали образцы, функционализированные лигандами с различной длиной углеводородной цепи (М-1 – М-5, табл. 1). НЧ брали в одинаковой концентрации ($25 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$, что соответствует $10^{12} \text{ НЧ}\cdot\text{мл}^{-1}$) и добавляли к ним идентичное количество фермента ($600 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$), аминокислоты которого образовывали ковалентную связь с карбоксильными группами лигандов. Кроме того, в отдельном эксперименте с НЧ, функционализированными липоевой кислотой (образец М-3), снижали количество добавляемого α -химотрипсина, что отражено в таблице 2.

Химическая структура лиганда для функционализации НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ достоверно не сказывалась на количестве связывающегося с ними фермента, которое составляло около 15% от исходного. При этом количество первичных аминокислот α -химотрипсина после его иммобилизации на НЧ во всех случаях составляло 5-7 в расчете на одну молекулу, что меньше по сравнению с теоретически доступным, равным 15, и означало успешную модификацию НЧ ферментом. При этом одна молекула может быть закреплена более чем на одной НЧ, что играет существенную роль в управлении активностью фермента. Теоретические расчеты показывают, что по сравнению с мономерными структурами «НЧ-фермент», в так называемых димерных конъюгатах «НЧ-фермент-НЧ»

достигаются бóльшие силы, действующие на молекулы α -химотрипсина за счет механического вращения НЧ под действием МП.

Таблица 2. Характеристика образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, функционализированных липоевой кислотой и варьируемым количеством иммобилизованного α -химотрипсина

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

Согласно данным НТА, для образцов ЕМ-3, ЕМ-3-1, ЕМ-3-2 основные пики наблюдались на 71 и 129; 85 и 137; 77 и 116 нм соответственно. Предположительно, меньшие частицы (от ~70 до ~80 нм) соответствовали конъюгатам α -химотрипсина с одной НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, а более крупные (диаметром ~ 116-137 нм) – конъюгатам, содержащим по меньшей мере две НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, связанные через молекулы α -химотрипсина. При этом соотношение интенсивностей пиков, соответствующих димерным структурам «НЧ-фермент-НЧ» и мономерам «НЧ-фермент», увеличивается с уменьшением концентрации α -химотрипсина, вводимого в систему. Это можно объяснить большей вероятностью одновременного связывания двух (или более) НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ с одной молекулой α -химотрипсина при меньшей концентрации белка.

Для изучения и последующей регуляции активности α -химотрипсина была выбрана катализируемая им реакция гидролиза р-нитроанилида N-бензоил-L-тирозина (BTNA) или р-нитроанилида N-сукцинил-L-аланил-L-аланил-пролил-L-фенилаланина (SAAPFNA). Продуктом обеих реакций является р-нитроанилин, имеющий максимум поглощения при 405 нм. Таким образом, за кинетикой реакций можно следить по зависимости поглощения продукта от времени (линейной для субстрата BTNA в течение 30 мин, для SAAPFNA – в течение 5-7 мин).

На первом этапе изучалась активность α -химотрипсина после многократного (3-4 экспозиции) воздействия МП (50 Гц, 137 мТл). Постановка эксперимента заключалась в сравнении кинетики гидролиза BTNA для двух идентичных порций реакционной смеси, одну из которых подвергали действию МП с паузами, а вторая была контрольной. Для образцов М-1, М-2, М-3, модифицированных ферментом, было обнаружено замедление каталитической реакции после каждой обработки в поле вплоть до итогового снижения скорости на 25-30%. Это может быть объяснено малой длиной и жесткостью L-цистеина и 3-меркаптопропионовой кислоты, а также наличием жесткого кольца и двух атомов серы в молекуле липоевой кислоты. В то же время, для образцов М-4 и М-5, модифицированных ферментом, скорость реакции оставалась практически неизменной. Это может быть следствием большой длины и гибкости молекул 11-меркаптоундекановой

и тиол-ПЭГ-кислоты, за счет чего воздействие МП на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ практически не передается ферменту и тем самым не влияет на его активность.

Принципиально обнаруженный эффект может быть вызван двумя причинами: влиянием МП непосредственно на иммобилизованный α -химотрипсин, либо на его реакцию с субстратом. Для выяснения того, какой из двух механизмов является преобладающим, была сделана серия экспериментов с добавлением субстрата уже после обработки раствора иммобилизованного α -химотрипсина в МП; в этом случае также наблюдалось замедление скорости реакции на 10-15%. Таким образом, подтверждается факт непосредственного влияния на структуру фермента.

Более детально эффект МП изучался на серии образцов ЕМ-3, ЕМ-3-1, ЕМ-3-2, где во всех случаях линкером выступала липоевая кислота и последовательно уменьшалось общее количество иммобилизованного белка в системе (рис. 9, табл. 2). Эффект МП в этом случае исследовали *in situ* в спектрофотометре, совмещенном с генератором поля, что отражено на рисунке 9, А. Уменьшение тангенса угла наклона прямой однозначно указывало на быстрое (в течение секунд) снижение каталитической активности иммобилизованного α -химотрипсина при включении МП.

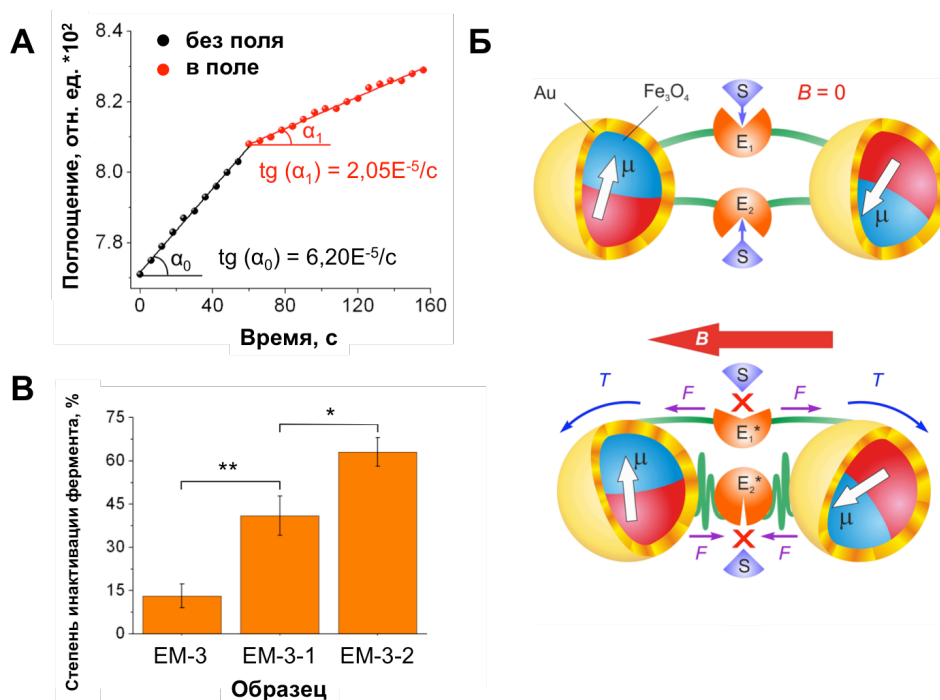


Рисунок 9. Изменение активности α -химотрипсина, иммобилизованного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, функционализированных липоевой кислотой, под воздействием переменного МП: (А) кинетическая кривая гидролиза SAAPFNA до и во время экспозиции в поле (88 мТл, 60 Гц), образец ЕМ-3-2; (Б) Схематическое изображение магнитомеханического эффекта поля: Т – вращательный момент; F – сила, действующая на молекулы α -химотрипсина, связанные с двумя НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$; B – амплитуда поля; μ – магнитный момент НЧ; E1, E2 – исходные молекулы фермента; E1*, E2* – деформированные молекулы фермента; S – субстрат. (В) Степень инактивации иммобилизованного фермента для образцов ЕМ-3, ЕМ-3-1 и ЕМ-3-2 (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, $n = 3$)

Переориентация НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (изменение направления магнитного момента μ) под действием МП с амплитудой B (рис. 9, Б) может индуцировать механические деформации молекул α -химотрипсина E1 и E2 (из-за появления силы F) в димерных конъюгатах «НЧ-фермент-НЧ», а именно их сжатие или растяжение (см. вращательные моменты T), что, в свою очередь, препятствует взаимодействию фермента с субстратом (S), вызывая снижение каталитической активности первого. Данные предположения справедливы для системы, в которой одна молекула фермента присоединена, по меньшей мере, к двум НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$. В связи с этим стояла задача сравнить величину эффект поля в ряду образцов ЕМ-3, ЕМ-3-1, ЕМ-3-2. Как видно из рисунка 9, В, наибольшая инактивация фермента наблюдалась для образца ЕМ-3-2, содержащего максимальную долю димеров по данным НТА. Наименьший эффект МП был обнаружен для образца ЕМ-3, имеющего в составе наибольшее содержание мономеров «НЧ-фермент». Стоит отметить, что эффект МП (инактивация) был обратимым, однако исходная активность фермента после воздействия МП восстанавливалась в течение нескольких часов. Данное явление можно объяснить релаксационными процессами, аналогичными тем, что происходят в молекулах полимеров после механической деформации с последующим снятием нагрузки.

Таким образом, НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ были успешно использованы для регулирования каталитической активности иммобилизованного α -химотрипсина при помощи переменного МП, а именно ее снижения вплоть до 36% от исходной за счет механических деформаций молекул фермента при переориентации магнитных НЧ, которые, согласно теории, генерируют осциллирующие силы $\approx 5\text{--}10$ пН, достаточные для изменения конформации биомолекул. С практической точки зрения данный подход может способствовать дистанционному включению / выключению ферментативных реакций.

6. НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ как платформа для тераностики и мультимодальной визуализации

Оптимизация химических и физических свойств для НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ размером 25 нм (образец 7) позволила достичь высокой контрастирующей и тепловыделительной способности в МРТ и ГМЧ *in vitro* в сочетании с возможностью как «одиночной», так и «двойной» селективной функционализации для отслеживания самих НЧ-носителей, а также загруженного действующего вещества. Завершающим этапом работы стало изучение НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ как платформы для тераностики и мультимодальной визуализации.

Для более детального изучения взаимодействия НЧ-Су5 с клетками 4T1 была исследована динамика их накопления в течение 24 ч (рис. 10). Накопление НЧ в цитоплазме обнаруживалось уже спустя 30 мин после внесения НЧ ($193 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $30 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1} \text{ Au}$, $6 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1} \text{ Су5}$) к клеткам, и увеличивалось спустя 6 ч (рис. 10, А). Свободный краситель Су5, используемый как контроль, в аналогичных условиях не накапливался в клетках. Интернализация НЧ-Су5 подтверждалась методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Оптические 3D-срезы однозначно свидетельствовали о том, что НЧ накапливались во внутриклеточном пространстве (не на поверхности клеточных мембран, рис. 10, Б). Количественная оценка накопления Fe_3O_4 и

Au в клетках, инкубированных в течение 48 ч с НЧ-PEG ($100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $15 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Au}$) методом АЭС подтверждает интернализацию НЧ на уровне $39 \pm 5\%$ от добавленной дозы (рис. 10, В).

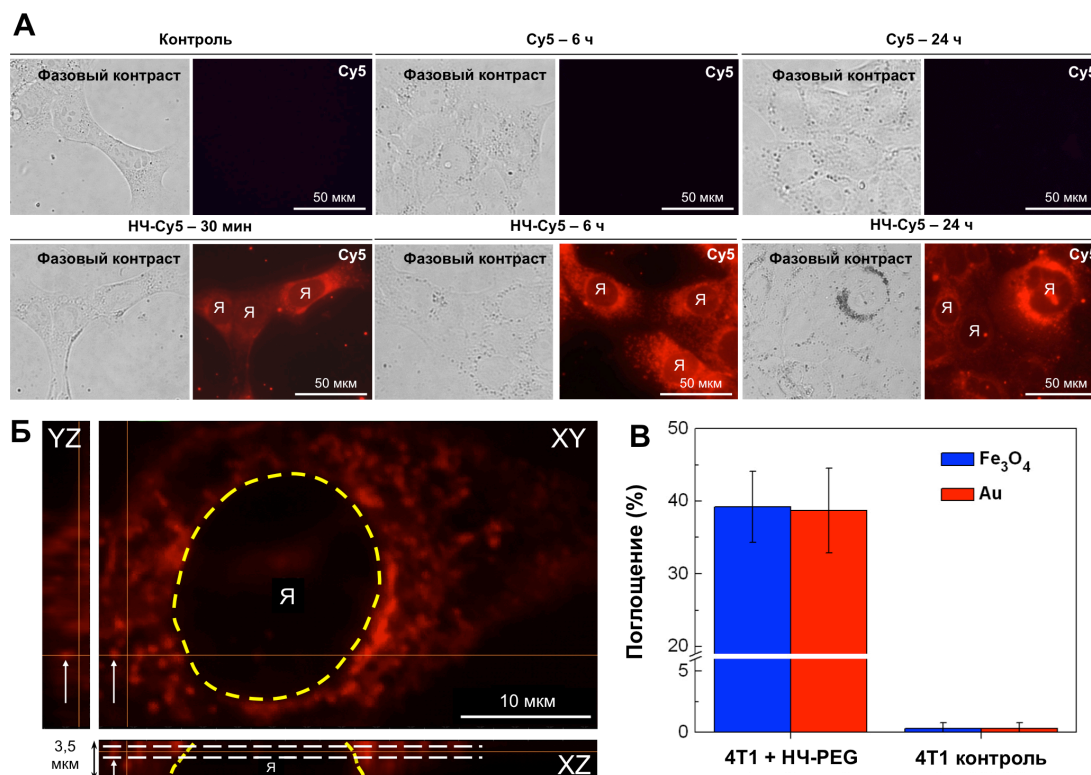


Рисунок 10. Интернализация гибридных НЧ Fe_3O_4 -Au. А) Динамика накопления свободного Су5 и НЧ-Су5 в клетках 4Т1, исследованная методом флуоресцентной микроскопии. Б) Проекция Z-стеков клетки 4Т1 после инкубации с НЧ-Су5 в течение 30 мин, конфокальная микроскопия. Белые стрелки указывают на НЧ внутри цитоплазмы в трех ортогональных проекциях на уровне ядра. В) Поглощение НЧ-PEG клетками 4Т1 после 48 ч инкубации ($100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$, $15 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Au}$), определенное методом АЭС

Доставка гибридных НЧ Fe_3O_4 -Au в ткань опухоли *in vivo* изучалась методом интравитальной микроскопии (ИВМ) при внутривенном введении НЧ-Су5 в дозе $6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$ лабораторным мышам с привитыми опухолями 4Т1, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок (GFP) (рис. 11). Спустя 1-3 мин после введения можно было наблюдать НЧ, устойчиво циркулирующие в сосудах опухоли без признаков агрегации (рис. 11, А). Спустя 15 мин после введения, НЧ-Су5 обнаруживались вне опухолевых сосудов, и интенсивность их флуоресценции продолжала расти в течение всего времени наблюдения (60 мин). Последующая динамика накопления НЧ-Су5 в опухолях была исследована методом *in vivo* флуоресцентной визуализации (IVIS). Через 1 ч после внутривенного введения НЧ в основном обнаруживались в печени и селезенке, однако спустя 6 ч после инъекции отчетливо наблюдалось накопление НЧ в опухолевой ткани (рис. 11, Б и В). Согласно данным количественного биораспределения НЧ-Су5 (АЭС), через 24 ч после инъекции до 3% от введенной дозы НЧ достигает опухоли.

Данная величина в три раза выше, чем средний показатель эффективности для пассивной доставки НЧ. Таким образом, при системном введении гибридные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ пассивно накапливаются в опухолевой ткани вследствие EPR-эффекта.

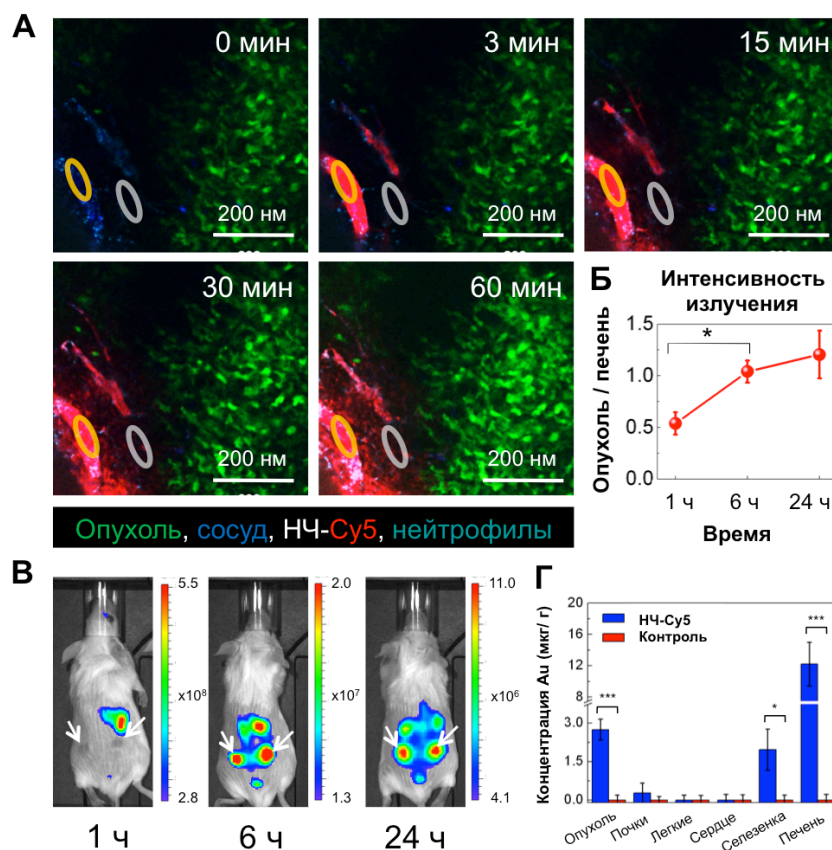


Рисунок 11. Накопление НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в опухоли 4Т1. А) Визуализация микроокружения опухоли с помощью ИВМ. Б) Соотношение интенсивности флуоресценции «опухоль/печень» после инъекции НЧ-Су5. В) Серия IVIS-изображений мыши, демонстрирующая накопление НЧ-Су5 в опухолях 4Т1. Г) Распределение НЧ-Су5 в организме мышей с привитыми опухолями 4Т1 через 24 ч после внутривенного введения (синие столбцы) по сравнению с контролем (красные столбцы)

Две различные поверхности для химической модификации делают гибридные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ уникальным инструментом для одновременного изучения биораспределения самих частиц-носителей, а также загруженного на них препарата. Это было продемонстрировано в работе на примере NRed-НЧ-Су5, доставка и распределение которых изучались методом ИВМ у мышей с привитыми опухолями 4Т1-GFP. Высвобождение Nile Red из НЧ в микроокружение опухоли удалось визуализировать в режиме реального времени. Видно, что в течение 2 мин после прикрепления NRed-НЧ-Су5 к стенке сосуда краситель уже диффундировал в окружающую опухолевую ткань. Спустя 6 ч после внутривенного введения NRed-НЧ-Су5 краситель Су5, связанный с НЧ, также обнаруживался в опухолевой ткани (рис. 12). При этом его колокализации с Nile Red не наблюдалось, по-видимому, вследствие высвобождения последнего с поверхности НЧ.

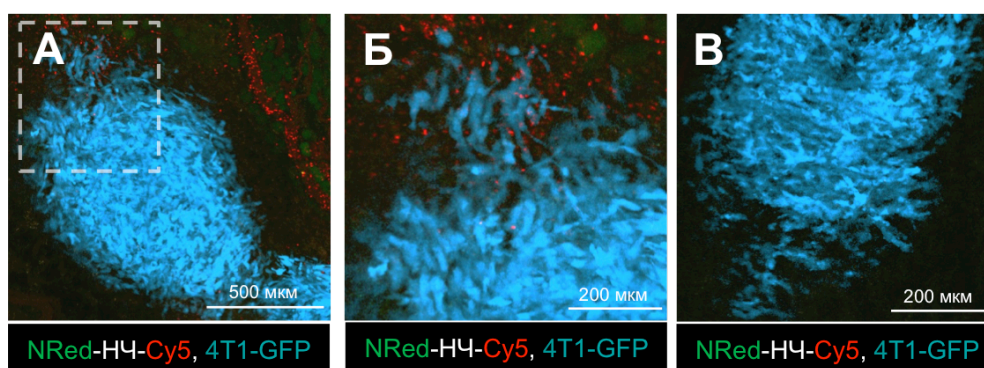


Рисунок 12. Доставка загруженного на НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ препарата *in vivo*. ИВМ-изображение опухоли 4T1-GFP (голубой цвет), накапливающей NRed-НЧ-Cy5 через 6 ч после внутривенного введения (А), зеленый цвет – Nile Red, красный - Cy5; увеличенное изображение опухоли (Б); визуализация опухоли 4T1-GFP контрольной мыши (В)

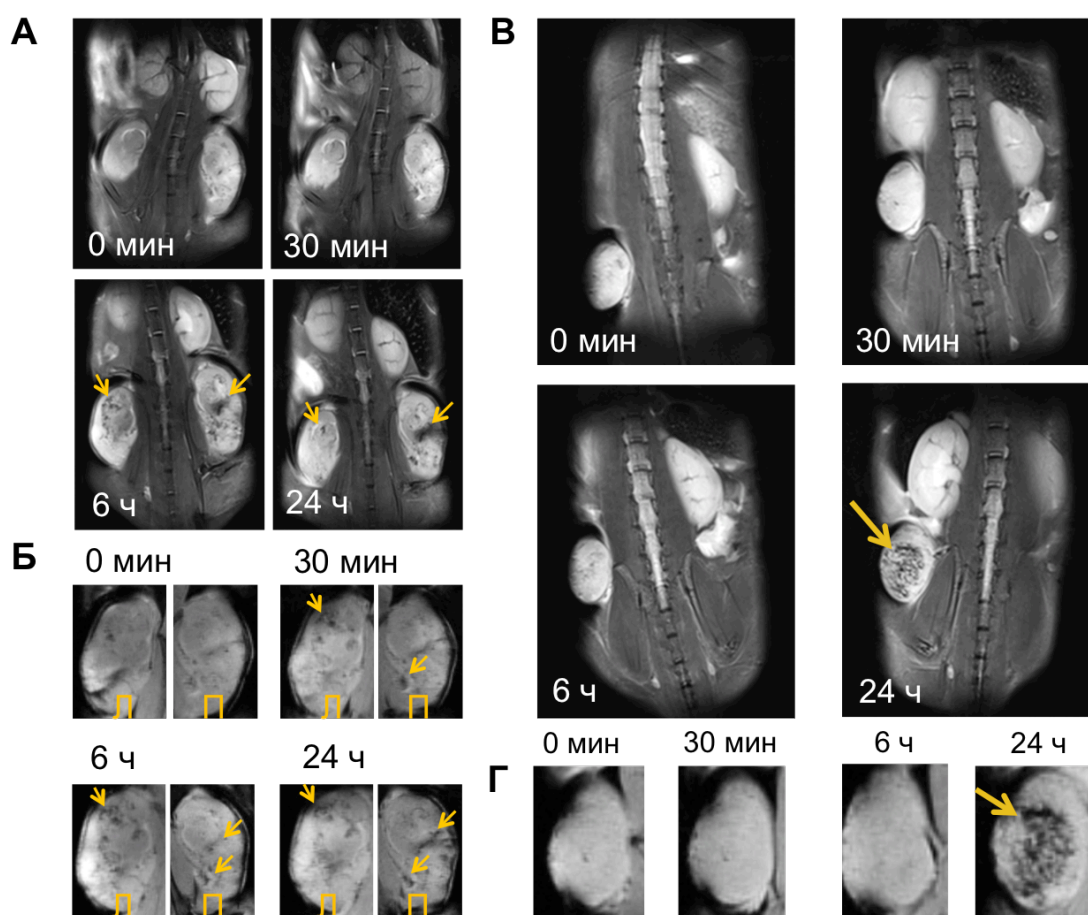


Рисунок 13. НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ как контрастные агенты в *in vivo* МРТ. А) Репрезентативные T_2 -взвешенные изображения мыши BALB/с с привитыми с двух сторон тела опухолями 4T1, полученные до, а также спустя 30 мин, 6 и 24 ч после внутривенного введения НЧ-PEG ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$); Б) Увеличенные изображения опухолей; В) Репрезентативные T_2 -взвешенные изображения мыши C57 / bl6 с привитой с правой стороны опухолью В16-F10, полученные до, а также спустя 30 мин, 6 и 24 ч после внутривенного введения НЧ-PEG ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$); Г) увеличенные изображения опухоли. Области с повышенной контрастностью опухоли обозначены стрелками

На заключительном этапе изучали потенциал НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ для МРТ диагностики *in vivo*. Для этого мышам с привитыми опухолями 4Т1 или В16-Ф10 внутривенно вводили НЧ-PEG ($6,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ Fe}_3\text{O}_4$) и проводили визуализацию методом МРТ спустя 30 мин, 6 ч и 24 ч после введения НЧ; соответствующие T_2 -взвешенные изображения представлены на рисунке 13. Несмотря на то, что через 30 мин после инъекции НЧ накопление последних было обнаружено, в основном, в печени, в более поздние моменты времени (6 ч и 24 ч) отчетливо наблюдалось усиление контраста опухоли. В соответствии с данными IVIS, пик накопления НЧ-PEG в опухолях также был выявлен спустя 6 или 24 ч после введения. Таким образом, НЧ могут быть использованы в качестве контрастных агентов для МРТ-диагностики *in vivo*, что делает гибридные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ перспективной платформой для тераностики, а также мультимодальной (МРТ и оптической) визуализации.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

В целом, предложенная система на основе НЧ магнетит-золото обладает высоким потенциалом для тераностики, а также мультимодальной (МРТ и оптической) визуализации опухолей 4Т1 и меланомы мыши В16-F10.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

*Список публикаций в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных
Web of Science, Scopus, RSCI*

1. **Efremova M.V.**, Naumenko V.A., Spasova M., Garanina A.S., Abakumov M.A., Blokhina A.D., Melnikov P.A., Prelovskaya A.O., Heidelmann M., Li Z.-A., Ma Z., Shchetinin I.V., Golovin Y.I., Kireev I.I., Savchenko A.G., Chekhonin V.P., Klyachko N.L., Farle M., Majouga A.G., Wiedwald U. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics// Scientific Reports 2018, V. 8: 11295
2. **Efremova M.V.**, Veselov M.M., Barulin A.V., Gribovsky S.L., Le-Deygen I.M., Uporov I.V., Kudryashova E.V., Sokolsky-Papkov M., Majouga A.G., Golovin Y.I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. In Situ Observation of Chymotrypsin Catalytic Activity Change Actuated by Nonheating Low-Frequency Magnetic Field// ACS Nano 2018, V. 12, P. 3190-3199
3. Головин Ю.И., Жигачев А.О., **Ефремова М.В.**, Мажуга А.Г., Кабанов А.В., Клячко Н.Л. Пути и методы управления биомолекулярными структурами с помощью магнитных наночастиц, активируемых переменным магнитным полем// Российские Нанотехнологии 2018, Т. 13 (5-6), С. 82-90
4. Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Мажуга А.Г., Грибановский С.Л., Головин Д.Ю., Жигачев А.О., Шуклинов А.В., **Ефремова М.В.**, Веселов М.М., Власова К.Ю., Усвалиев А.Д., Ле-Дейген И.М., Клячко Н.Л. Новые подходы к нанотераностике: полифункциональные магнитные наночастицы, активируемые негреющим низкочастотным магнитным полем, управляют биохимической системой с молекулярной локальностью и селективностью // Российские Нанотехнологии 2018, Т. 13 (5-6), С. 3–25
5. Erofeev A., Gorelkin P., Garanina A., Alova A., **Efremova M.**, Vorobyeva N., Edwards C., Korchev Y., Majouga A. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles// Scientific Reports 2018, V. 8: 7462
6. Omelyanchik A., Levada E., Ding J., Lendinez S., Pearson J., **Efremova M.**, Bessalova V., Karpenkov D., Semenova E., Khlusov I., Litvinova L., Abakumov M., Majouga A., Perov N., Novosad V., Rodionova V. Design of Conductive Microwire Systems for Manipulation of Biological Cells// IEEE Transactions on Magnetism 2018, V. 54 (6), P. 1-5
7. Рудаковская П.Г., Лебедев Д.Н., **Ефремова М.В.**, Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Клячко Н.Л., Головин Ю.И., Савченко А.Г., Мажуга А.Г. Наночастицы типа ядро-оболочка - магнетит-золото: получение и функционализация химотрипсином// Российские Нанотехнологии 2016, Т. 11 (3-4), С. 23-28
8. Majouga A., Sokolsky-Papkov M., Kuznetsov A., Lebedev D., **Efremova M.**, Beloglazkina E., Rudakovskaya P., Veselov M., Zyk N., Golovin Yu., Klyachko N., Kabanov A. Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: Synthesis, purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2015, V. 125, P. 104-109

9. Клячко Н.Л., Зайцева Е.А., Ефременко Е.Н., Кост О.А., Маникам Д., Нуколова Н.В., Мажуга А.Г., Головин Ю.И., Легоцкий С.А., Филатова Л.Ю., Мирошников К.А., Абакумов М.А., Лягин И.В., Чеснокова Н.Б., **Ефремова М.В.**, Рудаковская П.Г., Кузнецов А.А., Кабанов А.В. Новые бионаносистемы для медицинских применений. Развитие технологии «NanoZYME» в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова// Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия 2014, Т. 55 (3), С. 139 -147
10. Golovin Y.I., Klyachko N.L., Golovin D.Y., **Efremova M.V.**, Samodurov A.A., Sokolski-Papkov M., Kabanov A.V. A new approach to the control of biochemical reactions in a magnetic nanosuspension using a low-frequency magnetic field// Technical Physics Letters 2013, V. 39, P. 240-243
11. Klyachko N.L., Sokolsky-Papkov M., Pothayee N., **Efremova M.V.**, Gulin D.A., Pothayee N., Kuznetsov A.A., Majouga A.G., Riffle J.S., Golovin Y.I., Kabanov A.V. Change of the Enzyme Reaction Rate in Magnetic Nanosuspensions by Non-Heating Magnetic Field// Angewandte Chemie International Edition 2012, V. 51, P. 12016-12019

*Список публикаций, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при
Минобрнауки России*

1. **Ефремова М.В.**, Мажуга А.Г., Головин Ю.И., Клячко Н.Л. Наномеханика: адресная доставка лекарств// Природа 2016, Т. 7, С. 3-11.

Список публикаций в сборниках материалов и тезисов конференций

1. **Efremova M.**, Garanina A., Naumenko V., Abakumov M., Wiedwald U., Majouga A., Klyachko N. Hybrid magnetite-gold nanoparticles: new possibilities for theranostics// International Forum "Biotechnology: state of the art and perspectives", May 23-25, 2018, Moscow, Russia. Conference Proceedings, p. 26
2. Veselov M.M., **Efremova M.V.**, Uporov I.V., Kargov I.S., Tishkov V.I., Secundo F., Golovin Yu I., Klyachko N.L. Enzymatic reaction management via Brownian relaxation of magnetic nanoparticles under low-frequency magnetic field, 12-th International Conference on the scientific and Clinical Application of magnetic Carriers, May 22-26, 2018, Copenhagen, Denmark, p. 54
3. **Efremova M.V.**, Nalench Y.A., Naumenko V.A., Abakumov M.A., Spasova M., Farle M., Majouga A.G., Wiedwald U. and Klyachko N.L. Magnetite-gold Janus nanoparticles as all-in-one theranostics agents// DPG Spring Meeting, March 11-16, 2018, Berlin, Germany. Abstract Book of MA 33: Biomedical and molecular magnetism, p. 2
4. **Efremova M.**, Nalench Y., Garanina A., Naumenko V., Abakumov M., Spasova M., Farle M., Majouga A., Wiedwald U., Klyachko N. Magnetite-gold Janus nanoparticles: from physical aspects to in vivo application// DFG 29th Edgar Luescher Seminar, February 3-9, 2018, Klosters, Switzerland.
5. **Ефремова М.В.**, Наленч Ю.А., Науменко В.А., Гаранина А.С., Абакумов М.А., Преловская А.О., Wiedwald U., Spasova M., Farle M., Савченко А.Г., Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Мажуга А.Г. Платформа для тераностики на основе димерных наночастиц

магнетит-золото: от физических аспектов к экспериментам *in vivo*// II Международная научно-практическая школа-конференция «Магнитные наноматериалы в биомедицине», Сборник тезисов, 23 – 27 октября, 2017, Звенигород (Московская область), Россия. с. 114.

6. **Efremova M.**, Nalench Y., Naumenko V., Garanina A., Prelovskaya A., Abakumov M., Saltykova I., Savchenko A., Klyachko N., Majouga A. Synthesis and investigation of magnetite-gold hybrid nanoparticles for visualization and targeted delivery purposes// International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology "ICONAN-2017", September 25-27, 2017, Barcelona, Spain. Book of Abstracts, p. 46
7. **Efremova M.**, Nalench Y., Naumenko V., Garanina A., Abakumov M., Wiedwald U., Spasova M., Farle M., Savchenko A., Klyachko N., Majouga A. Novel platform for breast and liver diseases theranostics on the basis of magnetite-gold hybrid nanoparticles// International Baltic Conference on Magnetism "IBCM-2017", August 20-24, 2017, Kaliningrad, Russia. Book of Abstracts, p. 41
8. **Efremova M.V.**, Nalench Yu.A., Blokhina A.D., Garanina A.S., Abakumov M.A., Wiedwald U., Spasova M., Farle M., Savchenko A.G., Klyachko N.L., Majouga A.G. Synthesis and physical investigation of magnetite-gold hybrid nanoparticles for theranostic purposes// Moscow International Symposium on Magnetism "MISM-2017", July 1-5, 2017, Moscow, Russia. Book of Abstracts, p. 550
9. **Efremova M.V.**, Nalench Yu.A., Blokhina A.D., Garanina A.S., Abakumov M.A., Golovin Yu.I., Majouga A.G., Klyachko N.L. Synthesis and investigation of dumbbell-like magnetite-gold nanoparticles for magnetic resonance imaging and drug delivery// International conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications", June 25-30, 2017, Istra (Moscow Region), Russia, Abstracts, p. 233
10. **Efremova M.**, Tcareva I., Blokhina A., Grebennikov I., Garanina A., Abakumov M., Golovin Y., Savchenko A., Majouga A., Klyachko N. Magnetic field-sensitive carriers for biomolecules immobilization on the basis of magnetite-gold hybrid nanoparticles// 2nd International Scientific Conference "Science of the Future", September 20-23, 2016, Kazan, Russia. Proceedings of the Conference, p. 21-22
11. Veselov M.M., **Efremova M.V.**, Majouga A.G., Uporov I.V., Golovin Yu.I., Klyachko N.L. Nanomechanical approach for changing enzymatic rate of chymotrypsin, immobilized on magnetite@gold nanoparticles, under low-frequency magnetic field// Magnetic materials. New technologies (BICMM-2016): Abstracts of 7th Baikal International Conference, August 22-26, 2016, Irkutsk, Russia, p. 106-107
12. **Efremova M.**, Tcareva I., Blokhina A., Grebennikov I., Garanina A., Abakumov M., Golovin Y., Savchenko A., Majouga A., Klyachko N. New hybrid materials on the basis of magnetite and magnetite-gold nanoparticles for biomedical application// ECI conference "Nanotechnology in Medicine: From Molecules to Humans", July 3-8, 2016, Herrnstien, Austria. Book of Poster Abstracts, p. 5
13. **Efremova M.**, Tcareva I., Blokhina A., Garanina A., Grebennikov I., Abakumov M., Golovin Y., Savchenko A., Majouga A., Klyachko N. Magnetite-gold magnetic field-sensitive carriers for the immobilization of biomolecules: synthesis and investigation// 7th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues", 8-15 May, 2016, Heraklion, Greece. Final Program/Abstract Book, p. 41.

14. **Ефремова М.В.**, Блохина А.Д., Гаранина А.С., Гребенников И.С., Абакумов М.А., Щетинин И.В., Савченко А.Г., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л. Гибридные материалы на основе наночастиц магнетита и золота – синтез, структурное исследование и тестирование на живых системах// Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016», [Электронный ресурс], М.: МАКС Пресс, 2016
15. Блохина А.Д., **Ефремова М.В.**, Гребенников И.С., Гаранина А.С. Синтез, физико-химическая характеристика и биологическое тестирование гибридных наночастиц магнетит – золото// Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016», [Электронный ресурс], М.: МАКС Пресс, 2016
16. **Ефремова М.В.**, Царева Я.О., Рудаковская П.Г., Гребенников И.С., Блохина А.Д., Гаранина А.С., Абакумов М.А., Щетинин И.В., Савченко А.Г., Головин Ю.И., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л. Создание новых материалов на основе наночастиц Fe_3O_4 и $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ для биомедицинского применения// Международная научно-практическая школа-конференция «Магнитные наноматериалы в биомедицине», Сборник тезисов, 28 – 30 октября, 2015, Звенигород (Московская область), Россия. с. 36-38.
17. **Efremova M.**, Tcareva I., Rudakovskaya P., Grebennikov I., Garanina A., Abakumov M., Shetinin I., Savchenko A., Majouga A., Klyachko N. Synthesis, functionalization and physical-chemical investigation of magnetite nanoparticles for biomedicine// International Baltic Conference on Magnetism: Focus on Biomedical Aspects, Book of Abstracts, 30 August-3 September, 2015, Svetlogorsk (Kaliningrad region), Russia, p.32.
18. Tcareva I., **Efremova M.**, Rudakovskaya P., Grebennikov I., Garanina A., Abakumov M., Shetinin I., Salikhov S., Savchenko A., Majouga A. Synthesis, research and functionalization of gold-coated magnetite nanoparticles with «core-shell» structure// International Baltic Conference on Magnetism: Focus on Biomedical Aspects, Book of Abstracts, 30 August-3 September, 2015, Svetlogorsk (Kaliningrad region), Russian Federation, p. 88.
19. **Efremova M.V.**, Tcareva I.O., Rudakovskaya P.G., Grebennikov I.S., Garanina A.S., Abakumov M.A., Shetinin I.V., Savchenko A.G., Golovin Y.I., Majouga A.G., Klyachko N.L. Synthesis, functionalization and physical-chemical investigation of magnetite nanoparticles for biomedical application// International Conference «Biocatalysis-2015: Fundamentals & Applications», Program and Book of Abstracts, June 21-26, 2015, Istra (Moscow Region), Russian Federation, p. 89-90.

Патенты на изобретения

1. **Ефремова М.В.**, Клячко Н.Л., Мажуга А.Г., Рудаковская П.Г., Савченко А.Г., Царева Я.О. Способ покрытия наночастиц магнетита слоем золота// Патент РФ № 2620166, дата приоритета: 14.12.2015, дата выдачи: 23.05.2017