

## «Изучение токсического действия суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) на организм мыши»

«Использование новых подходов, синтез и применение новых материалов для наномедицины, протезирования, медицинской диагностики, лечения онкологических и других заболеваний»

Развитие широкого спектра технологий, основанных на применении наноразмерных материалов в медицине и биологии, открыло новые возможности в диагностике и лечении ряда заболеваний.

Актуальность использования ультрадисперсных материалов определяется их физико-химическими свойствами, позволяющими создавать материалы с качественно новыми свойствами.

Уникальные свойства наночастиц открывают новые перспективы применения нанопрепаратов в терапии различных заболеваний, в том числе онкологических. Значительная часть исследований в области наномедицины посвящена разработке принципиально новых лекарственных средств с использованием магнитных наночастиц в качестве носителя в системах доставки лекарственных препаратов в ткани- и клетки-мишени, также в качестве самостоятельных терапевтических агентов для создания резонансной гипертермии и в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии.

Однако в настоящее время недостаточно внимания уделено вопросам кинетики и элиминации наночастиц в живом организме, а также возможным токсическим эффектам, связанным с введением наночастиц металлов в системный кровоток. Поскольку при отсутствии надлежащих механизмов элиминации и выведения наночастицы, вероятно, способны накапливаться, повреждая ткани организма.

Целью работы является изучить токсические воздействия суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) на живой организм. Для этого провести эксперимент по изучению токсичности наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> покрытый ПЭГ на живом организме (мышь).

По результатам общего анализа крови было подтверждено, что при однократном внутривенном введении суспензии в PBS в дозе 10 мг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/кг самцам мышей (C57BL/6хCBA)F1 видимых признаков токсичности исследуемого соединения выявлено не было.

Помимо этого гистологическое исследование показало, что Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> накапливается в основном в печени и селезенке, в небольших количествах наблюдается в легких, отсутствует в миокарде и почках. Таким образом, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> не оказывает токсического эффекта в использованных экспериментальных моделях *in vivo*.

## Введение

Наночастицы - это относительно новые и малоисследованные объекты, которые имеют характерные размеры от единиц до ста нанометров, то есть всего в 10 ... 100 раз больше атомов, так что в них значительная доля атомов, обычно более 1 %, находится на поверхности. Так как поверхностные атомы и молекулы имеют повышенную реакционную способность, то они присоединяют к себе атомы среды. В результате частицы имеют сложное строение, практически всегда - ядро и оболочку, часто - внешние функциональные группы.

Поэтому наночастицы и наноматериалы обладают комплексом физических, химических свойств и биологическим действием, которые часто радикально отличаются от свойств этого же вещества в форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий [1]. В наноразмерном состоянии можно выделить следующие физико-химические особенности поведения веществ:

-увеличение химического потенциала веществ на межфазной границе высокой кривизны;

- большая удельная поверхность наноматериалов;
- небольшие размеры и разнообразие форм наночастиц;
- высокая адсорбционная активность;
- высокая способность к аккумуляции.

В настоящее время в мире зарегистрировано и выпускается промышленностью более 1800 наименований наноматериалов. Согласно данным о форме и химическом составе можно выделить следующие основные виды наноматериалов:

- углеродные наночастицы (фуллерены, нанотрубки, графен, углеродные нанопены),
- наночастицы простых веществ (не углерода),
- наночастицы бинарных соединений,
- препараты наночастиц сложных веществ.

Основными областями применения наночастиц в технике становятся:

-создание высокопрочных, в том числе композитных, конструкционных материалов;

-микроэлектроника и оптика (микросхемы, компьютеры, оптические затворы и т.д.);

-энергетика (аккумуляторы, топливные элементы, высокотемпературная сверхпроводимость и др.);

-химическая технология;

- военное дело;

-научные исследования (метки и индикаторы);

-охрана окружающей среды (наночипы и наносенсоры);

-парфюмерно-косметическая промышленность (составная часть солнцезащитных кремов);

-сельское хозяйство (эффективная доставка средств защиты растений и удобрений, нанокапсулирование вакцин);

-пищевая промышленность (фильтры для очистки воды, наночипы для идентификации сроков хранения продукции и обнаружения патогенных микроорганизмов).

В медицине наноматериалы находят применение для целей транспорта лекарственных средств, в шовных и перевязочных материалах, для создания биосовместимых имплантантов и др. [2].

Лекарства, упакованные в наночастицы, гораздо лучше традиционных форм. Во-первых, действующее вещество оказывается защищенным от воздействия организма и невредимым достигает нужного органа, где и высвобождается, снижая тем самым побочные действия на другие органы. Во-вторых, в организм удается вводить вещества, которые не растворяются в биологических жидкостях. Наконец, перемещением такого лекарства в организме можно управлять с помощью внешних полей [3].

Помимо того, наночастицы используются в онкологии. Ведь одной из основных проблем лечения онкологических больных являются побочные эффекты химиотерапии,

вызываемые противоопухолевыми препаратами. В результате их системного введения лишь менее 1 % препаратов достигает цели (раковых клеток), тогда как основная часть поражает здоровые ткани организма. Таким образом, разработка новых методов целевой доставки лекарственных средств с помощью магнитного нацеливания представляет собой наиболее перспективное направление использования магнитных наночастиц в онкологии [4-7].

Помимо магнитного нацеливания существует подход, при котором наночастицы конъюгируют с опухолеспецифичными антителами, что способствует селективному накоплению наночастиц даже при внутривенном введении в место, отделенное от опухолевого очага. Такой подход получил название биологического нацеливания [8,9].

Одним из перспективных вспомогательных методов целевой доставки лекарственных средств является использование в качестве «транспортёров» липосом, липидных везикул, состоящих из природных фосфолипидов. Липосомы, нагруженные наночастицами, позволяют комбинировать диагностику и лечение, инкапсулируя контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии (МРТ) вместе с лекарствами [10,11]. В данном случае наночастицы используются в качестве якоря для притягивания нагруженных липосом к мишени, например к опухоли. Более того, применение липосом решает также проблему растворимости и коллоидной стабильности наночастиц [12,13].

Использование магнитолипосом имеет также ряд других преимуществ: возможность покрытия их поверхности специфическими лигандами, например антителами или рецепторами (для биологического нацеливания); защита инкапсулированного лекарственного средства. Кроме того, возможна разработка ряда стратегий контролируемого высвобождения инкапсулированных лекарств с помощью биологических или физических триггеров (например, pH-чувствительность, тепловая чувствительность) [14-16].

Неоспоримым достоинством магнитных наночастиц является возможность их визуализации *in vivo*, что позволяет контролировать эффективность нацеливания и аккумуляции наночастиц в органах-мишенях. Успех визуализации магнитных наночастиц с помощью магнитного резонанса *in vivo* зависит от контрастных свойств используемых материалов и чувствительности регистрирующей аппаратуры [17].

Одним из перспективных направлений использования наноматериалов для терапии в онкологии является метод управляемой гипертермии металлических магнитных наночастиц, введенных в опухоль. Гипертермия - многообещающее направление в онкологии, получившее «второе дыхание» благодаря развитию нанотехнологий [18-20].

Тем не менее недостаточное внимание уделено исследованию токсичности, а также механизмам элиминации и биораспределения наночастиц *in vivo*.

### **Материалы и методы**

Методом механохимического синтеза получены наноразмерные суперпарамагнитные порошки магнетита ( $Fe_3O_4$ ) (Томский Научный Центр Сибирского отделения РАН)

Перед введением суспензия для получения однородности подвергалась сонификации в ультразвуковой бане (Elmasonic S 10 H) при 36° С в течении 20-30 мин.

При внутривенном введении суспензии в PBS в дозе 10 мг  $Fe_3O_4$ /кг мышей.

В работе использованы самцы мышей гибридов (C57BL/6хCBA)F1, 8-12 недельного возраста, весом 30 грамм, полученные из питомника экспериментально-биологической клиники СО РАМН в количестве 36 голов.

Все мыши были разделены на 3 группы по 12 мышей в каждой.

Первой, контрольной группе мыши внутривенно в хвост вводился фосфатный буфер (PBS) -500мкл.

Во второй группе также в хвостовую вену мыши вводилась суспензия наноразмерного суперпарамагнитного магнетита ( $Fe_3O_4$ ) - 500мкл, содержащая 10 мг  $Fe_3O_4$ /кг.

В третьей группе мышам вводился тот же магнетит, но уже покрытый полиэтиленгликолем (ПЭГ) для предотвращения взаимодействия с тканями организма. Каждая мышь получала внутривенно 500мкл, содержащих 10 мг  $Fe_3O_4$ /кг.

У четырёх мышей из каждой группы на 1-е, 4-е и 6-е сутки проводился общий анализ

крови. Для этого у мышей отрезался кончик хвоста (1-2 мм) и собиралась кровь в количестве 20 мкл. Анализ крови проводился на гематологическом анализаторе PCE-90 (ERMA INC., Japan).

Для статистической обработки данных использовалась программа Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.), тест Манн-Уитни. Различия принимались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты общего анализа крови мышей показали, что содержание гемоглобина в крови во всех группах снижается на 4-й день, группа с введённым  $Fe_3O_4$  обладает более высоким уровнем гемоглобина по сравнению с контролем (статистически не значимо). На 6 сутки уровень гемоглобина возвращается к начальному. Рис. 1.

Содержание эритроцитов на протяжении 5-ти суток не изменялось. Статистически значимое отклонение было обнаружено только на 6 сутки между группами с введённым  $Fe_3O_4$  и контрольной группой. Контрольная группа обладает более высоким уровнем содержания эритроцитов. Рис. 2.

Содержание тромбоцитов во всех группах на 1-е сутки ниже чем на 4-е. К 6-м суткам содержание тромбоцитов выравнивается. Между группами на протяжении всего эксперимента статистически значимых отклонений, содержания тромбоцитов, не выявлено. Рис. 3.

На 1-е сутки группа с введённым  $Fe_3O_4$  обладает более высоким уровнем содержания лейкоцитов по сравнению с контролем (статистически не значимо). На 6-е сутки также содержание гемоглобина у группы с введённым  $Fe_3O_4$  выше, чем у контроля (статистически не значимо). В 3-й группе, где вводился  $Fe_3O_4$  покрытый ПЭГ, наблюдается более низкий уровень содержания лейкоцитов в крови (статистически значимо). Рис. 4.

Таким образом, при внутривенном введении суспензии в PBS в дозе 10 мг  $Fe_3O_4$ /кг самцам мышей гибридов (C57BL/6хCBA)F1 видимых признаков токсичности исследуемого соединения выявлено не было. Поведение, состояние волосяного покрова и слизистых оболочек, потребление корма и воды оставались без видимых изменений. В головном мозге, печени, почках и сердце видимых изменений не наблюдалось.

### Заключение

Биологическая стабильность, малый размер, растворимость в водных растворах, не токсичность – эти свойства делают наночастицы, производимые человечеством, полезными для широкого круга приложений в различных областях жизни. Эти же свойства вызывают обеспокоенность ученых с точки зрения долгосрочного влияния наночастиц на здоровье человека и окружающую среду. В настоящее время недостаточно внимания уделено вопросам кинетики и элиминации наночастиц в живом организме, а также возможным токсическим эффектам, связанным с введением наночастиц металлов в системный кровоток. Однако наша работа показала, что существенных различий в содержании гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитов и эритроцитов не наблюдается. За исключением содержания эритроцитов на шестые сутки между контрольной группой и группой с введённым  $Fe_3O_4$  и содержанием лейкоцитов на 4-е сутки между контрольной группой и группой с введённым  $Fe_3O_4$  покрытым ПЭГ.

Однако различия в количестве эритроцитов и лейкоцитов не значительны, что даёт основание считать, что при однократном введении суспензии наноразмерного суперпарамагнитного магнетита ( $Fe_3O_4$ ) токсического действия на живой организм не оказывается. Помимо этого гистологическое исследование показало, что  $Fe_3O_4$  накапливается в основном в печени и селезенке, в небольших количествах наблюдается в легких, отсутствует в миокарде и почках. Таким образом,  $Fe_3O_4$  не оказывает токсического эффекта в использованных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*.

По результатам нашей работы можно сделать следующие выводы:

1. При внутривенном введении суспензии в PBS в дозе 10 мг  $Fe_3O_4$ /кг самцам мышей (C57BL/6хCBA)F1 видимых признаков токсичности исследуемого соединения выявлено не

было.

2. Полученные данные открывают новые возможности для целенаправленного использования наноразмерного суперпарамагнитного магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) для индивидуальной терапии.

Из чего следует, что данное направление является перспективным и требует большего количества исследований.

### Информационные ресурсы:

1. Губин С.П., Кокшаров Ю.А., Хомутов Г.Б., Юрков Г.Ю. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // Успехи химии. 2007. Т.74, № 6. С. 539-574.
2. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 г. Москва “Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов”. Регистрационный № 10528.
3. [http://nanorf.ru/events.aspx?cat\\_id=224&d\\_no=2259](http://nanorf.ru/events.aspx?cat_id=224&d_no=2259)
4. Ito A., Tanaka K., Honda H. et al. Complete Regression of Mouse Mammary Carcinoma with a Size Greater than 15 mm by Frequent Repeated Hyperthermia Using Magnetite Nanoparticles. J. Biosci. Bioeng. 2003. 96(4): 364-369.
5. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. J. Phys. D: Appl. Phys. 2003. 36:R 167-R181.
6. Jurgons R., Seliger C., Hilpert A. et al. Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy // J. Phys.: Condens. Matter. 2006. 18:S2893-S2902.
7. Ito A., Honda H. Kobayasi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles // J. Biosci. Bioengng. 2005. 100(1):1-11.
8. Le B., Shinkai M., Kilade T. et al. Preparation of tumor specific magnetoliposomes and their application for hyperthermia. J Chem Eng Jpn. 2001. 34:66-72.
9. Shinkai M., Le B., Honda H. et al. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigenspecific magnetoliposomes. Jap. J. Cancer. Res. 2001. 92(10): 1138-1145.
10. Zielhuis S.W., Seppenwoolde J.H., Mateus V.A. et al. Lanthanide-loaded liposomes for multimodality imaging and therapy. Cancer Biother Radiopharm. 2006, 5:520-527.
11. Zheng J. Precise pathological and molecular diagnosis is the premise of relevant anti-cancer targeted therapy. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2007 36(7):433-434.
12. Kobayashi H., Lin P.C. Nanotechnology for antiangiogenic cancer therapy. Nanomedicine (Lond). 2006 1:17-22.
13. Petersson K., Ilver D., Johansson C., Krozer A. Brownian motion of aggregating nanoparticles studied by photon correlation spectroscopy and measurements of dynamic magnetic properties. Analytica Chimica Acta. 2006.28:573-574.
14. Fortin-Ripoche J.P., Martina M.S., Gazeau F. et al. Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in Mice: Feasibility. Radiology. 2006. 2(239):415-424.
15. Hossann M., Wiggenhorn M., Schwerdt A. et al. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. Biochim. Biophys. Acta. 2007. 1768(10):2491-9.
16. Kale A.A., Torchilin V.P. Enhanced transfection of tumor cells in vivo using "Smart" pH-sensitive TAT-modified pegylated liposomes. J Drug Target. 2007. 15(7):538-545.
17. Lee J., Huh Y, Jun J Y. et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. Nature Medicine. 2007. 13(1):95-99.
18. Cavalier R., Ciocatto E.C., Giovanella B.C. et al. Selective heat sensitivity of cancer cells // Biochemical and clinical studies. Cancer. 1967. 20:1351-1381.
19. Stauffer P.R., Cetas T.C., Fletcher A.M. et al. Observations on the use of ferromagnetic implants for inducing hyperthermia. IEEE Trans. Biomed.
20. Ikeda N., Hayashida O., Kameda H. et al. Experimental study on thermal damage to dog normal brain. Int J Hyperthermia. 1994. 10(4):553-561.