

На правах рукописи



Марченко Ярослав Юрьевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНЫХ И НЕЛИНЕЙНЫХ
МАГНИТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВОДНЫХ СУСПЕНЗИЙ БЕЛКОВЫХ
КОНЬЮГАТОВ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА**

01.04.03 – Радиофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)» (СПбГЭТУ «ЛЭТИ»), кафедра физики, и ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России (ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России), лаборатория медицинских нанотехнологий

Научный руководитель – **Богачев Юрий Викторович,**

кандидат физико-математических наук, доцент кафедры физики СПбГЭТУ «ЛЭТИ», (г. Санкт-Петербург)

Официальные оппоненты:

Чарная Елена Владимировна,

доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики твердого тела, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», (г. Санкт-Петербург)

Давыдов Вадим Владимирович,

доктор физико-математических наук, профессор Высшей школы прикладной физики и космических технологий ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», (г. Санкт-Петербург)

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе» Российской академии наук (ФТИ РАН), (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «22» декабря 2020 года в 15³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.238.08, созданного на базе ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)» и на сайте университета www.etu.ru в разделе «Подготовки кадров высшей квалификации» - «Объявление о защитах»

Автореферат разослан «21» октября 2020 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.238.08
кандидат технических наук



Смирнов Е.А.

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Среди инструментальных методов высокой информативности, удовлетворяющих практические потребности человека в области жизнеобеспечения, магнитно-резонансная томография (МРТ) занимает особое место. Информативность метода МРТ определяется его чувствительностью и разрешающей способностью к морфологии изучаемого объекта. Достижимая аппаратурная четкость магнитно-резонансных (МР) изображений в большинстве используемых в Российской Федерации МРТ-сканерах (1, 1.5 Тл) часто не удовлетворяет растущим требованиям дифференциальной диагностики в медицине. Усиление информативности метода МРТ в настоящее время связано с развитием молекулярной МРТ, что достигается, прежде всего, использованием новых мультимодальных контрастирующих агентов и применением более сильных (3, 7 и 11 Тл) магнитных полей. Особое значение приобретает также МР-нанотераностика, где высокие диагностические возможности метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) сочетаются с адресной доставкой терапевтических мультимодальных агентов для проведения избирательной терапии ряда социально-значимых заболеваний (онкологических, нейродегенеративных и т. п.).

К настоящему времени очерчен круг молекул-биолигандов, способных узнавать рецепторы на отдельных клетках. Наиболее востребованными являются целевые молекулы, ориентированные на рецепторы мембран злокачественных клеток. Конъюгация таких биолигандов с магнитными наночастицами (МНЧ) открывает путь к формированию нового класса адресных МР-контрастирующих препаратов.

В качестве таких мультимодальных агентов в данной работе предложено использовать конъюгаты магнитных наночастиц оксида железа (МНЧ-К) с биолигандами на основе белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ), эпидермального фактора роста (ЭФР) и гранзима В (ГрВ).

Сложная организация водных суспензий МНЧ-К порождает ряд вопросов, связанных с изменением пространственного распределения магнитных полей вокруг магнитных ядер наночастиц из-за эффектов экранирования и частичной ассоциации наночастиц с образованием крупных магнитных агрегатов, и с возможным изменением механизмов ЯМР-релаксации протонов воды. Для лучшего понимания этих вопросов необходима информация о физико-химических свойствах МНЧ и их конъюгатов в водных суспензиях, поведении агрегатов МНЧ в сильных магнитных полях, дисперсии агрегатов наночастиц по размерам, магнитных характеристиках ядер наночастиц и др. В водных суспензиях наночастицы склонны к агрегации, приводящей к их седиментации и

изменению свойств препарата. Ввиду сложности получения стабильных водных суспензий МНЧ-К необходим быстрый и надежный метод контроля их качества, метод оценки стабильности нанодисперсных суспензий МНЧ. Актуальной задачей является также оценка магнитно-резонансной контрастирующей эффективности данных препаратов.

Целью работы является исследование ядерного магнитного резонанса протонов в условиях пространственно-временных искажений локального магнитного поля, вызванных присутствием наночастиц, обладающих нелинейными магнитными характеристиками.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи**:

1. Исследование ЯМР-релаксации продольной и поперечной компонент спиновой намагниченности протонов водных суспензий в присутствии МНЧ и МНЧ-К.
2. Исследование магнитных характеристик МНЧ методом продольного нелинейного отклика (регистрируется компонента намагниченности на второй гармонике частоты возбуждения).
3. Исследование МР-контрастирующей эффективности МНЧ и МНЧ-К.
4. Исследование процессов агрегатообразования МНЧ и специфического связывания МНЧ-К с антителами в водных суспензиях методом ЯМР-релаксометрии.

Объект исследования: магнитные наночастицы оксида железа и их конъюгаты с белками БТШ, ЭФР и ГрВ.

Предмет исследования: времена T_1 , T_2 , T_2^* ЯМР-релаксации спиновой намагниченности протонов водных суспензий МНЧ и МНЧ-К, продольный нелинейный отклик МНЧ на второй гармонике частоты возбуждения на действие переменного магнитного поля.

Методы исследования

В работе применялись радиофизические методы исследования: ЯМР-релаксометрия, МРТ, метод нелинейного отклика на второй гармонике частоты возбуждения на действие слабого линейно поляризованного гармонического магнитного поля в параллельном ему постоянном магнитном поле (ПНО- M_2). Для характеристики структуры, состава и размеров МНЧ и МНЧ-К использовались методы электронной микроскопии (ПЭМ), динамического рассеяния света (ДРС) и метод рентгеновской дифракции (РД).

Научная новизна работы заключается в том, что впервые:

1. Получены ЯМР-релаксационные характеристики протонов водных суспензий МНЧ-К (БТШ), МНЧ-К (ЭФР) и МНЧ-К (ГрВ) в магнитном поле 7.1 Тл. Данные ЯМР-релаксационных измерений свидетельствуют о том, что конъюгация наночастиц с

белками не вызывает нарушения оболочки магнитного центра МНЧ, сохраняя их высокую ЯМР-релаксационную эффективность.

2. Экспериментально показано, что МНЧ-К приводят к ускорению поперечной ЯМР-релаксации протонов водных суспензий, что описывается механизмом неоднородного уширения линий ЯМР в магнитно-дисперсных средах в дипольном приближении.
3. Методом ЯМР-релаксометрии установлено, что наибольшей седиментационной устойчивостью в магнитном поле 7.1 Тл обладают суспензии МНЧ и МНЧ-К со средним диаметром ниже 65 нм в диапазоне концентраций железа (0.02 – 2) мМ·л⁻¹. С увеличением концентрации МНЧ процесс агрегатообразования в водных суспензиях МНЧ в магнитном поле 7.1 Тл ускоряется по сравнению с магнитным полем с индукцией 0.33 Тл. Магнитная пробоподготовка может быть использована для выделения мелкодисперсной фракции МНЧ для приготовления контрастирующих агентов на основе МНЧ и МНЧ-К.
4. Методом ПНО- M_2 найдено, что синтезированные МНЧ являются однодоменными и проявляют суперпарамагнитное поведение, которое характеризуется отсутствием гистерезиса сигнала нелинейного отклика M_2 . Выявлен параметр – аналог коэрцитивной силы ферромагнетиков H_{c2} , описывающий релаксационное поведение отдельных доменов в переменном магнитном поле. Показано существование температуры блокировки для реализации суперпарамагнитного состояния синтезированных МНЧ.
5. Экспериментальные данные и численное моделирование сигнала нелинейного отклика на основе стохастического уравнения Гильберта-Ландау-Лифшица позволили определить набор среднестатистических геометрических, магнитных и магнитодинамических параметров, характеризующих систему МНЧ.
6. Методом ПНО- M_2 обнаружено, что МНЧ и МНЧ-К в водных суспензиях образуют полидисперсную систему агрегатов наночастиц. Внутри агрегатов наночастицы магнитно коррелированы в квазисферической области радиусом ~ 50 нм из-за сильно выраженного диполь-дипольного взаимодействия. Агрегаты обладают достаточно сильной магнитной анизотропией, которая обеспечивает связь магнитных и вращательных степеней свободы, приводящую к частичной ориентации агрегатов постоянным магнитным полем порядка 10^4 А·м⁻¹. Динамика намагничивания МНЧ позволяет делать выводы о нахождении магнитных наночастиц суспензии в агрегированном или неагрегированном состоянии.
7. Методом МРТ на модельных образцах установлена негативная ЯМР-релаксационная природа контраста МР-изображений в присутствии МНЧ и МНЧ-К. Качество

контрастирования МР-изображений зависит от концентрации и магнитных свойств используемых МНЧ и МНЧ-К, а также от параметров используемых импульсных радиочастотных последовательностей. Наибольший контраст МР-изображений в присутствии МНЧ и МНЧ-К наблюдался при использовании последовательности TurboRARE-T2.

8. Обнаружен эффект ЯМР-релаксационного переключения при взаимодействии МНЧ-К (БТШ) со специфичными антителами к БТШ, МНЧ-К (ЭФР) со специфичными антителами к ЭФР, МНЧ-К (ГрВ) с БТШ.
9. Методом ПНО- M_2 установлено, что поглощение МНЧ-К (БТШ) опухолевой тканью происходит в ~ 40 раз интенсивнее, чем нормальной мозговой тканью, что на порядок больше подобного соотношения для неконъюгированных МНЧ.

Практическую значимость работы представляют следующие результаты:

1. Экспериментальные данные зависимости ЯМР-релаксации протонов водных суспензий МНЧ и МНЧ-К от концентрации железа и времени нахождения в магнитном поле могут быть использованы при контроле качества мультимодальных МР-контрастирующих агентов по параметрам ЯМР-релаксационной эффективности и агрегационной устойчивости препаратов наночастиц.
2. Результаты, полученные в ходе исследования ЯМР-релаксации водных суспензий МНЧ-К в присутствии специфичных антител, найдут применение в разработках метода медицинской экспресс-диагностики и портативного ЯМР-биосенсора для обнаружения в крови онкомаркеров.
3. Показана возможность адресной доставки МНЧ-К в опухолевую зону с одновременным усилением МР-контраста пораженной области по отношению к окружающим тканям, что может найти применение в медицинской тераностике онкологических заболеваний.
4. Метод ПНО- M_2 может быть использован для характеристики структурных и магнитных свойств наночастиц на предварительной стадии синтеза и подготовки МНЧ и МНЧ-К как диагностических агентов.
5. Метод ПНО- M_2 показал большую чувствительность по сравнению с методом ЯМР-релаксометрии для целей количественного определения содержания магнитных наночастиц в исследуемых объектах, что может быть использовано в развитии метода *MPI* в визуализации распределения МНЧ и МНЧ-К в тканях.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов подтверждаются воспроизводимостью результатов и согласием с данными, полученными при помощи других методов, опубликованных в научной литературе.

Личный вклад автора

Лично автором синтезированы образцы МНЧ. Автор принимал участие в синтезе МНЧ-К и магнитной микросферической целлюлозы. Все эксперименты ЯМР и интерпретация результатов выполнены лично автором. Автором лично обработаны ПЭМ изображения образцов и получены гистограммы распределения размеров наночастиц и их агрегатов. Автор принимал участие в экспериментах МРТ и продольного нелинейного отклика. Анализ данных МРТ выполнен лично автором. Анализ данных продольного нелинейного отклика выполнен с участием автора.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Релаксационное поведение намагниченности протонов при ядерном магнитном резонансе в водных суспензиях наночастиц оксида железа и их конъюгатов определяется характерными особенностями локальных градиентов магнитных полей, возбуждаемых магнитными центрами и зависящих от структуры и конфигурации агрегатов наночастиц.
2. Наибольшей стабильностью и седиментационной устойчивостью в сильном магнитном поле (до 7.1 Тл) обладают суспензии наночастиц оксида железа в декстрановой оболочке с эффективным диаметром агрегатов наночастиц менее 65 нм.
3. Исследованные агрегаты состоят из однодоменных наночастиц и являются магнитно анизотропными образованиями. Существует сильная разупорядоченность осей магнитной анизотропии и магнитных моментов наночастиц внутри агрегата, где наночастицы магнитно коррелированы в квазисферической области радиусом ~ 50 нм из-за сильно выраженного диполь-дипольного взаимодействия.
4. Наличие оболочки и белков-лигандов не снижает поперечной ЯМР-релаксационной эффективности магнитных наночастиц. Поперечная ЯМР-релаксационная эффективность синтезированных конъюгатов магнитных наночастиц (для конъюгата с эпидермальным фактором роста $r_2^* = (316 \pm 16)$ л $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, для конъюгата с белком теплового шока $r_2^* = (387 \pm 19)$ л $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) выше, чем у зарубежного коммерческого контрастирующего агента с наночастицами на основе оксида железа FluidMAG-DX (Chemicell, Германия) ($r_2^* = (263 \pm 13)$ л $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$).
5. Качество контрастирования МР-изображений зависит от концентрации и магнитных свойств используемых наночастиц, а также от параметров используемых импульсных радиочастотных последовательностей. Наибольший контраст МР-изображений в присутствии магнитных наночастиц и их белковых конъюгатов наблюдается при использовании последовательности TurboRARE-T2.

По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ, из них 13 – статьи в журналах, включенных в базы данных Web of Science и Scopus, 10 – статьи в журналах, входящих в перечень ВАК. В сборниках всероссийских и международных научных конференций и трудах научных школ опубликовано 13 работ.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на конференциях, основные из которых перечислены ниже:

1. 17th International School-Conference. Magnetic Resonance and its Applications. Spinus-2020. March 29 – April 3. 2020. Saint Petersburg. Russia.
2. 15th International School-Conference. Magnetic Resonance and its Applications. Spinus-2018. April 1 – 6. 2018. Saint Petersburg. Russia.
3. 14th International Youth School-Conference. Magnetic Resonance and its Applications. Spinus-2017. April 23 – 29. 2017. Saint Petersburg. Russia.
4. 12-я Зимняя молодежная школа-конференция магнитный резонанс и его приложения. 2015. Санкт-Петербург. Россия.
5. International Symposium and Summer School in Saint Petersburg: Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 11th meeting: "Biomolecular NMR and related phenomena" 7 – 11 July. 2014. Saint-Petersburg. Russia.
6. 10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. June 2014. Dresden. Germany.
7. International Symposium and Summer School in Saint Petersburg: Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 10th meeting: "NMR in Life Sciences" 8 – 12 July. 2013. Saint-Petersburg. Russia.
8. International Symposium and Summer School in Saint Petersburg: Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 9th meeting: "NMR in Heterogeneous Systems" 9 – 13 July. 2012. Saint-Petersburg. Russia.
9. 9th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. 2012. Minneapolis. USA.
10. Euromar «Magnetic Resonance Conference». 2011. Frankfurt am Main. Germany.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Работа изложена на 149 страницах и включает в себя 54 рисунка и 5 таблиц. Список литературы содержит 200 источников.

Краткое содержание диссертации

Во введении указана актуальность работы.

Первая глава посвящена рассмотрению общих теоретических закономерностей взаимодействия протонов с переменными магнитными полями в условиях нахождения их в постоянном однородном и неоднородном магнитном поле, рассмотрены основные механизмы ЯМР-релаксации, приведены результаты теоретического рассмотрения основных положений работы. Рассмотрены существующие принципы и подходы инструментального управления МР-контрастом, а также влияние на него магнитных свойств среды. Рассмотрено применение МНЧ в качестве тераностических агентов. Приведены общие сведения о понятии суперпарамагнетизма. Указана зависимость магнитного состояния МНЧ от их размера. Приведены понятия критического объема МНЧ и температуры блокировки. Рассмотрены методы визуализации и гипертермии с помощью магнитных наночастиц.

Во второй главе описаны методические аспекты приготовления МНЧ и МНЧ-К и методы исследования полученных образцов. Размеры и структуру наночастиц определяли методом ПЭМ на электронном микроскопе JEM-100С (JEOL, Япония), ДРС на установке Zetasizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания), РД на дифрактометре ДРОН-3М (Буревестник, Россия). Концентрацию железа определяли тиоцианатным методом, концентрацию белка – по методу Лоури. Исследования магнитного состояния проводились на оригинальной установке для изучения магнетиков методом ПНО- M_2 . Времена ЯМР-релаксации измеряли на ЯМР-спектрометре СХР-300 (Bruker, Германия) и ЯМР-релаксометре «Спин Трэк» (Россия). МР-изображения получали на томографе AVANCE II 500 (Bruker, Германия).

В третьей главе приводятся оригинальные экспериментальные данные изучения магнитных и структурных характеристик синтезированных наночастиц. Экспериментальные исследования структурных характеристик синтезированных МНЧ показывают, что условия реакции соосаждения обеспечивают выход МНЧ со средним диаметром ядер порядка 10 нм. Распределение диаметров магнитных ядер наночастиц соответствует логарифмически нормальному. Плотность распределения:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma x}} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \ln^2\left(\frac{x}{x_0}\right)\right), \quad (1)$$

где x – диаметр, $\bar{x} = x_0 \exp(\sigma^2/2)$ – среднее выборочное значение, x_0 – медиана, σ – параметр распределения, $x_0^2 \exp(\sigma^2(\exp \sigma^2 - 1))$ – дисперсия.

Распределения диаметров агрегатов МНЧ и МНЧ-К, полученные по микрофотографиям, также являются логнормальными. Среднее значение диаметров агрегатов МНЧ составило (43 ± 2) нм, агрегатов неочищенной суспензии МНЧ (н/о) – (79 ± 4) нм, а диаметров агрегатов МНЧ-К – (65 ± 4) нм. По данным ДРС среднее значение диаметров агрегатов МНЧ – (52 ± 7) нм.

Согласно положениям наблюдаемых дифракционных пиков, полученных методом РД, структура МНЧ соответствует Fe_3O_4 . Средний размер области кристалличности наночастиц – (8.7 ± 1.3) нм, согласующийся с данными ПЭМ, был определен по ширине дифракционных пиков в соответствии с формулой:

$$\beta_{hkl} \cos \theta = \frac{k\lambda}{d} + 4\varepsilon \sin \theta, \quad (2)$$

где β_{hkl} – ширина линии hkl -отражения, расположенного под углом 2θ ; d – размер кристаллитов; $k \approx 0.9$; $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ – длина волны излучения $\text{Cu K}\alpha_1$; ε – индуцированное деформацией уширение, возникающее из-за несовершенства кристаллов и искажений.

Экспериментальные исследования магнитных характеристик синтезированных МНЧ показывают, что сигнал продольного нелинейного отклика МНЧ регистрируется (рис. 1) в виде вещественной (синий цвет – прямой ход сканирования, розовый – обратный) и мнимой (зеленый цвет – прямой ход сканирования, красный – обратный) компонент M_2 как функции постоянного магнитного поля. Аппроксимирующие кривые (черный цвет на рис. 1) получены методом численного моделирования. Уменьшение частоты сканирования поля H до 0.25 Гц ведет к полному устранению гистерезиса, не влияя на другие параметры, что подтверждает динамический характер гистерезиса, характерный для однодоменных наночастиц.

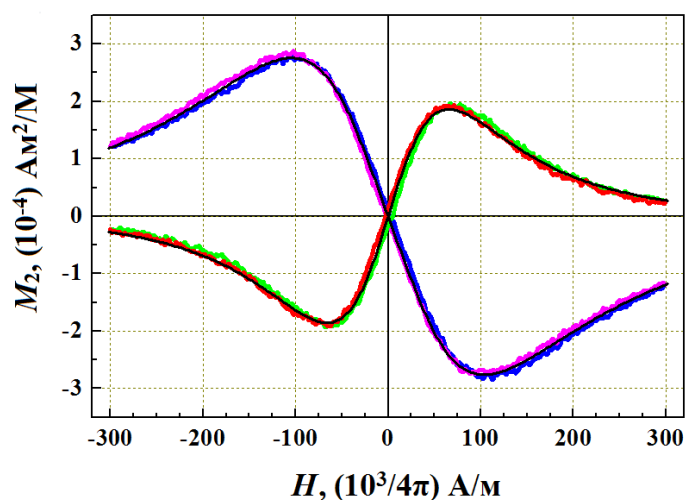


Рисунок 1. Кривые нелинейного отклика M_2 водной суспензии МНЧ на частоте развертки поля H 8 Гц при температуре 297 К. Концентрация железа $0.02 \text{ мМ}\cdot\text{л}^{-1}$.

Основные магнитные и структурные параметры агрегатов МНЧ, полученные методом численного моделирования экспериментальных кривых нелинейного отклика M_2 приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Параметры агрегатов МНЧ, полученные методом ПНО- M_2 : без учета магнитных корреляций (левый столбец), с учетом конечного радиуса корреляций (правый столбец)

Параметр	Без учета	С учетом
Намагниченность насыщения на моль Fe M_S , $A \cdot m^2 \cdot M^{-1}$	257.5 ± 1.6	702 ± 1
Намагниченность насыщения на ион Fe $\langle \mu \rangle$, μ_B	0.0454 ± 0.0003	0.127 ± 0.001
Средний магнитный момент \bar{M} , μ_B	47950 ± 170	61200 ± 100
Ширина распределения σ_M	0.341 ± 0.002	2.11 ± 0.01
Средняя энергия анизотропии E_a , К	171 ± 3	254 ± 22
Поле анизотропии H_a , $(10^3/4 \pi) A \cdot m^{-1}$	53.2 ± 1.1	61.8 ± 0.7
Средний угол анизотропии ψ , $^\circ$	10.71 ± 0.17	12.7 ± 0.1
Коэффициент затухания α	0.2246 ± 0.0008	0.2283 ± 0.0007
Неелевское время релаксации $\bar{\tau}_N$, с	$(1.442 \pm 0.007) \cdot 10^{-9}$	$(1.81 \pm 0.01) \cdot 10^{-9}$
Средний объем \bar{V} , nm^3	$(2.565 \pm 0.001) \cdot 10^4$	$(3.80 \pm 0.01) \cdot 10^4$
Средний диаметр \bar{D} , нм	36.1 ± 0.02	25.4 ± 0.01
Среднее число ионов Fe \bar{N}	$(1.04 \pm 0.01) \cdot 10^6$	$(1.54 \pm 0.01) \cdot 10^6$

Согласно данным ПНО- M_2 МНЧ образуют полидисперсную систему агрегатов, состоящих из ~ 55 наночастиц. Оценена толщина оболочки декстрана (1.4 – 1.7) нм, не наблюдаемая в ПЭМ. По данным ПНО- M_2 внутри агрегатов наночастицы магнитно коррелированы в квазисферической области радиусом ~ 50 нм из-за выраженного диполь-дипольного взаимодействия. Агрегаты обладают магнитной анизотропией, которая обеспечивает связь магнитных и вращательных степеней свободы, приводящую к частичной ориентации агрегатов постоянным магнитным полем $\sim 10^5/4 \pi$ ($A \cdot m^{-1}$). Показана возможность применения нового метода измерений на основе продольного нелинейного отклика M_2 для комплексной количественной характеристики геометрических, магнитных и магнитодинамических параметров, характеризующих систему МНЧ, что особенно актуально при разработке широкого спектра суперпарамагнитных систем, в частности, для биомедицинского применения.

В четвертой главе приводятся результаты исследований ЯМР-релаксации и МР-контрастирующих свойств модельных образцов МНЧ, МНЧ-К и магнитных микросфер пористой целлюлозы (ММЦ), их обсуждение в рамках теоретической модели ЯМР-релаксации в локальном неоднородном магнитном поле, создаваемом агрегатами наночастиц. Методом ЯМР-релаксометрии показано сильное нарушение однородности магнитного поля вокруг МНЧ, через которое диффундируют протоны. Времена ЯМР-релаксации T_1 , T_2 протонов воды измерены при помощи импульсных последовательностей «инверсия-восстановление» и «Кара-Парселла-Мейбума-Гилла (CPMG)», соответственно. Время эффективной релаксации T_2^* рассчитывали по ширине линии ^1H ЯМР-спектров в соответствии с формулой:

$$T_2^* = \frac{1}{\pi \Delta\nu_{\frac{1}{2}}^{\text{набл.}}}, \quad (3)$$

где $\Delta\nu_{\frac{1}{2}}^{\text{набл.}}$ – ширина линии сигнала ЯМР, взятая на половине высоты его пика.

Коэффициенты релаксационной эффективности r_1 , r_2 , r_2^* (табл. 2) определялись по уравнению линейной зависимости скоростей ЯМР-релаксации от концентрации железа:

$$R_i = r_i C + A, \quad (4)$$

где $R_i = 1/T_i$ (с^{-1}) – скорость ЯМР-релаксации протонов водной суспензии наночастиц, C ($\text{мМ} \cdot \text{л}^{-1}$) – концентрация железа в образце, A – константа, $i = 1, 2, 2^*$.

Таблица 2.

Релаксационные эффективности образцов в водных суспензиях и растворах

Образец	r_2^* , $\text{л} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	r_2 , $\text{л} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	r_1 , $\text{л} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
МНЧ (н/о)	451 ± 23	270 ± 14	1.41 ± 0.07
МНЧ	513 ± 26	301 ± 15	1.55 ± 0.08
MAG-DX	263 ± 13	260 ± 13	0.87 ± 0.04
МНЧ-К (ЭФР)	316 ± 16	216 ± 11	0.33 ± 0.02
МНЧ-К (БТШ)	387 ± 19	211 ± 11	1.27 ± 0.06
Раствор FeCl_3	46 ± 2	39 ± 2	12.5 ± 0.6
ММЦ	661 ± 33	2.1 ± 0.1	0.87 ± 0.04

В зависимости от соотношения длины диффузионного пробега протона между участками неоднородностей магнитного поля в окрестности наночастиц, их размерами и расстоянием между ними выделены два режима ЯМР-релаксации: статический и режим диффузионного усреднения. Механизм ЯМР-релаксации поперечной спиновой

намагниченности протонов водных суспензий МНЧ и МНЧ-К (< 100 нм) определяется диффузионным усреднением магнитных полей. Высокое значение r_2^* для ММЦ объясняется большим эквивалентным магнитным моментом МНЧ внутри пор целлюлозы. Значение $r_2 \ll r_2^*$ для ММЦ свидетельствует об эффективности рефокусирующих РЧ импульсов в пределе статического режима ЯМР-релаксации. Экранирование магнитных полей ядер МНЧ присоединенными белками не вызывает значимого снижения релаксационной эффективности (табл. 2). Конъюгация МНЧ с БТШ и ЭФР через карбодиимид не вызывает нарушения магнитных ядер МНЧ. Декстрановая оболочка сохраняет свою целостность при конъюгации, защищая магнитное ядро от химических воздействий среды. МНЧ и МНЧ-К являются негативными МР-контрастирующими агентами, поскольку $r_2/r_1 \gg 1$.

Методом ЯМР-релаксометрии исследована седиментационная устойчивость образцов МНЧ. Показано, что наибольшей стабильностью в однородном магнитном поле 7.1 Тл обладают суспензии со средним диаметром агрегатов ниже 65 нм в концентрационном диапазоне железа (0.02 – 2) мМ·л⁻¹. Суспензия МНЧ (н/о) теряет стабильность в магнитном поле 7.1 Тл из-за образования крупных агрегатов, подверженных быстрой седиментации из области датчика ЯМР. С увеличением концентрации наночастиц процесс ускоряется. Магнитное поле 0.33 Тл не способствует значительному агрегатообразованию в водных суспензиях МНЧ. Магнитная пробоподготовка может применяться для выделения мелкодисперсной фракции МНЧ.

Контрастирующую эффективность МНЧ оценивали по распределению интенсивности МР-изображений по шкале серого (рис. 2) для различных концентраций железа и для различных импульсных РЧ последовательностей.

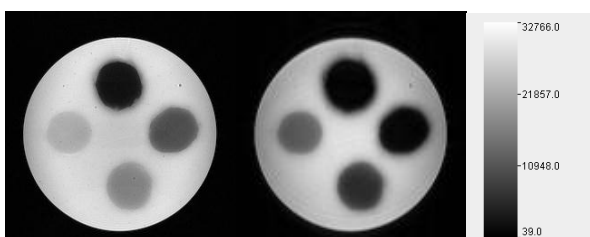


Рисунок 2. МР-изображение аксиального сечения гелевого фантомного образца с МНЧ в режимах импульсных последовательностей MSME (слева), TurboRARE-T2 (по центру). Шкала серого (справа).

Методом МРТ на фантомных гелевых образцах и животных моделях установлено негативное МР-контрастирующее действие МНЧ-К, сходное с МНЧ (рис. 3).

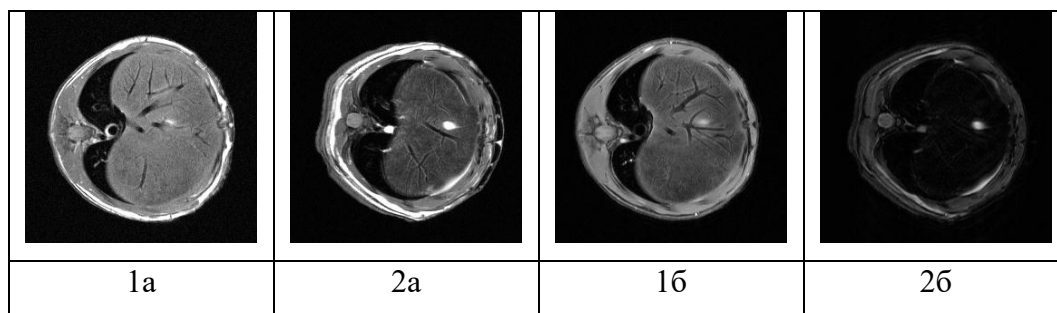


Рисунок 3. МР-изображения аксиального сечения области печени мышей. 1 – контроль, 2 – введение МНЧ-К (ЭФР) (0.04 мг Fe), а – MSME, б – Turbo-RARE-T2.

Негативный МР-контраст проявлялся непосредственно в местах локализации наночастиц и достигал наибольшего значения в режиме TurboRARE-T2. Парентеральное введение МНЧ-К (ЭФР) сопровождалось ослаблением интенсивности МР-сигнала в области печени как органа наибольшей аккумуляции наночастиц.

Проведены эксперименты по измерению T_2 водных суспензий МНЧ-К с течением времени в магнитном поле при наличии в образце белков и специфических антител в различных концентрациях. Время ЯМР-релаксации T_2 уменьшается на начальных стадиях агрегатообразования, вызванных взаимодействием антитела с антигеном. Увеличение размеров агрегатов приводит к возникновению статического режима расфазирования с последующим увеличением времени T_2 окружающих протонов. Образование крупных агрегатов, выпадающих из зоны детектирования ЯМР-спектрометра, ведет к увеличению времени T_2 протонов воды. Методом ЯМР-релаксометрии показано агрегатообразование за счет специфического связывания МНЧ-К (БТШ) с антителами к БТШ, МНЧ-К (ЭФР) с антителами к ЭФР и МНЧ-К (ГрВ) с БТШ, что дает возможность для создания метода экспресс-диагностики патологических состояний при обнаружении белков и антител в биологических жидкостях. МНЧ-К могут быть эффективны в качестве тераностических агентов при МРТ-диагностике и терапии злокачественных новообразований.

Методом ПНО- M_2 было исследовано биораспределение МНЧ и МНЧ-К (БТШ) в различных органах крысы, а также их накопление в опухолевой ткани. Анализ данных ПНО- M_2 показал, что поглощение МНЧ-К (БТШ) опухолевой тканью в ~ 40 раз больше поглощения МНЧ-К (БТШ) нормальной мозговой тканью, что на порядок выше подобного соотношения для неконъюгированных МНЧ. Метод ПНО- M_2 позволяет оценивать по амплитуде $M_2(H)$ относительное содержание МНЧ в опухоли головного мозга по сравнению с нормальной мозговой тканью и тканями других органов и сравнивать с контрастирующей эффективностью наночастиц в МРТ. Метод ПНО- M_2 может быть использован для характеристики магнитных свойств наночастиц на предварительной

стадии синтеза и подготовки МНЧ как тераностических агентов для применения в МР- или *MPI*-тераностике. Накопление МНЧ-К (БТШ) в нормальной мозговой ткани незначительно, что может позволить проведение гипертермии опухолевой области, накопившей МНЧ-К (БТШ).

В заключении приводятся основные результаты диссертации.

Список основных научных трудов автора по теме диссертационного исследования

Публикации в изданиях, включенных в перечень ВАК:

1. Марченко Я.Ю., Николаев Б.П. Магнитная гетерогенность пористых материалов и ее проявление в спектрах ЯМР // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – 2019. – № 1. – С. 16 – 21.
2. Марченко Я.Ю., Яковлева Л.Ю., Злобина О.В., Ищенко А.М., Николаев Б.П., Шевцов М.А., Рыжов В.А. Исследование методом нелинейного магнитного отклика и магнитно-резонансной томографии биораспределения магнитных наночастиц в животных моделях глиальных опухолей человека // Цитокины и воспаление. – 2018. – Т. 17. – № 1 – 4. – С. 108 – 113.
3. Богачев Ю.В., Никитина А. В., Марченко Я.Ю. Оптимизация параметров импульсных радиочастотных последовательностей для улучшения контраста магнитно-резонансных изображений в присутствии магнитных наночастиц // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – 2018. – № 9. – С. 11 – 21.
4. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Marchenko Y.Y., Yakovleva L.Y., Dobrodumov A.V., Török G., Pitkin E., Lebedev V. T. Magnetic Resonance Imaging of Rat C6 Glioma Model Enhanced by Using Water-Soluble Gadolinium Fullerene // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – Vol. 45. – № 4. – P. 303 – 314.
5. Марченко Я.Ю., Николаев Б.П., Шишкин А.Н., Яковлева Л.Ю. Исследование влияния альбумина на агрегацию магнитных наночастиц оксида железа методом ЯМР релаксации // Коллоидный журнал. – 2013. – Т. 75. – № 2. С. – 206 – 212. Английская версия: Marchenko Y.Y., Nikolaev B.P., Shishkin A.N., Yakovleva L.Y. An NMR-relaxation study of the effect of albumin on aggregation of magnetic iron oxide nanoparticles // Colloid Journal. – 2013. – Vol. 75. – № 2. – P. 185 – 190.
6. Богачев Ю.В., Марченко Я.Ю., Николаев Б.П. Исследования ЯМР контрастирующих свойств суперпарамагнитных наночастиц оксида железа // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – 2012. – № 2. – С. 10 – 15.

7. Зимина Т.М., Соловьев А.В., Лучинин В.В., Баранов Г.А., Николаев Б.П., Яковлева Л.Ю., Марченко Я.Ю., Елисеев О.В. Исследование магнитных наносuspензий биомедицинского применения // Биотехносфера. – 2011. – № 1 – 2 (13 – 14). – С. 75 – 86.

Публикации в изданиях, включенных в базы данных Web of Science, Scopus:

8. Bogachev Yu.V., Nikitina A.V., Frolov V.V., Marchenko Ya.Yu., Nikolaev B.P. Optimization of Parameters of RF Pulse Sequences for MRI Investigations in the Presence of Magnetic Nanoparticles // Technical Physics. – 2020. – Vol. 65. – № 9. – P. 1416 – 1420.
9. Bogachev Yu.V., Marchenko Ya.Yu., Nikitina A.V., Nikolaev B.P. Investigations and Modeling of the Effect of Magnetic Nanoparticles on MR Image Contrast // Applied Magnetic Resonance. – 2020. – Vol. 51. – № 2. – P. 117 – 127.
10. Ryzhov V.A., Kiselev I.A., Smirnov O.P., Chernenkov Yu.P., Deriglazov V.V., Marchenko Ya.Yu., Yakovleva L.Y., Nikolaev B.P., Bogachev Yu.V. Comprehensive characterization of magnetite-based colloid for biomedical applications // Applied Physics A. – 2019. – Vol. 125. – № 5 (322). – P. 1 – 11.
11. Shevtsov M., Stangl S., Nikolaev B., Yakovleva L., Marchenko Y., Tagaeva R., Sievert W., Pitkin E., Mazur A., Tolstoy P., Galibin O., Ryzhov V., Steiger K., Smirnov O., Khachatryan W., Chester K., Multhoff G. Granzyme B Functionalized Nanoparticles Targeting Membrane Hsp70-Positive Tumors for Multimodal Cancer Theranostics // Small. – 2019. – Vol. 15. – № 13 (1900205). – P. 1 – 14.
12. Shevtsov M., Nikolaev B., Marchenko Y., Yakovleva L., Skvortsov N., Mazur A., Tolstoy P., Ryzhov V., Multhoff G. Targeting experimental orthotopic glioblastoma with chitosan-based superparamagnetic iron oxide nanoparticles (CS-DX-SPIONs) // International Journal of Nanomedicine. – 2018. – Vol. 13. – P. 1471 – 1482.
13. Parr M., Illarionov R., Marchenko Y., Yakovleva L., Nikolaev B., Ischenko A., Shevtsov M. Switching assay as a novel approach for specific antigen-antibody interaction analysis using magnetic nanoparticles // Journal of Physics: Conference Series. – 2016. – Vol. 741. – № 1 (012062). – P. 1 – 5.
14. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A., Yakovleva L.Y., Dobrodumov A.V., Marchenko Y.Y., Margulis B.A., Pitkin E., Mikhrina A.L., Guzhova I.V., Multhoff G. Detection of experimental myocardium infarction in rats by MRI using heat shock protein 70 conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticle // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 12. – № 3. – P. 611 – 621.
15. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Yakovleva L.Y., Parr M.A., Marchenko Y.Y., Eliseev I., Yudenko A., Dobrodumov A.V., Zlobina O., Zhakhov A., Ischenko A.M., Pitkin E., Multhoff

- G. 70-kDa heat shock protein coated magnetic nanocarriers as a nanovaccine for induction of anti-tumor immune response in experimental glioma // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – Vol. 220. – P. 329 – 340.
16. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A., Yakovleva L.Y., Dobrodumov A.V., Marchenko Y.Y., Margulis B.A., Pitkin E., Guzhova I.V. Brain tumor magnetic targeting and biodistribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles linked with 70-kDa heat shock protein study by nonlinear longitudinal response // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2015. – Vol. 388. – P. 123 – 134.
17. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A., Yakovleva L.Y., Marchenko Y.Y., Parr M.A., Rolich V.I., Mikhrina A.L., Dobrodumov A.V., Pitkin E., Multhoff G. Ionizing radiation improves glioma-specific targeting of superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with cmHsp70.1 monoclonal antibodies (SPION-cmHsp70.1) // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – № 48. – P. 20652 – 20664.
18. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Yakovleva L.Y., Marchenko Y.Y., Dobrodumov A.V., Mikhrina A.L., Martynova M.G., Bystrova O.A., Yakovenko I.V., Ischenko A.M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor (SPION-EGF) for targeting brain tumors // *International Journal of Nanomedicine*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. 273 – 287.
19. Shevtsov M.A., Yakovleva L.Y., Nikolaev B.P., Marchenko Y.Y., Dobrodumov A.V., Onokhin K.V., Onokhina Y.S., Selkov S.A., Mikhrina A.L., Guzhova I.V., Martynova M.G., Bystrova O.A., Ischenko A.M., Margulis B.A. Tumor targeting using magnetic nanoparticle Hsp70 conjugate in a model of C6 glioma // *Neuro-Oncology*. – 2014. – Vol. 16. – № 1. – P. 38 – 49.
20. Nikolaev B.P., Marchenko Y.Y., Yakovleva L.Y., Zimina T.M., Soloviev A.V., Luchinin V.V., Petrov A.V., Scharafutdinova T.A., Dobrodumov A.V. Magnetic Epidermal Growth Factor Conjugate for Targeted Delivery to Grafted Tumor in Mouse Model // *IEEE Transactions on Magnetics*. – 2013. – Vol. 49. – № 1. – P. 429 – 435.

Монография

21. Богачев Ю.В., Князев М.Н., Марченко Я.Ю., Наумова А.Н., Тютюкин К.В., Фокин В.А., Фролов В.В., Черненко Ю.С. Диагностический магнитный резонанс. – СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – 2013. – 212 с.