

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Хабирова Софья Юрьевна

**Функционализированные макроциклическими лигандами
наночастицы оксида церия (IV) и гексаферрита стронция для
хелатирования ^{65}Zn , ^{207}Bi , ^{44}Sc**

Специальность 1.4.13 Радиохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2024

Диссертационная работа выполнена в лаборатории радиофармацевтической химии на кафедре радиохимии Химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – **Алешин Глеб Юрьевич**,
кандидат химических наук

Официальные оппоненты – **Винокуров Сергей Евгеньевич**,
доктор химических наук, главный научный сотрудник
лаборатории радиохимии, заместитель директора по
научной работе Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Ордена Ленина и
Ордена Октябрьской Революции Институт геохимии и
аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской
академии наук (ГЕОХИ РАН)

Соболев Александр Сергеевич,
доктор биологических наук, профессор, член-
корреспондент РАН, профессор кафедры биофизики
биологического факультета Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В.
Ломоносова», заведующий лабораторией молекулярной
генетики внутриклеточного транспорта Федерального
государственного бюджетного учреждения Института
биологии гена РАН

Абакумов Максим Артемович,
кандидат химических наук, доцент кафедры
медицинских нанобиотехнологий МБФ Федерального
государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования "Российский
национальный исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова" Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «04» декабря 2024 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы 1 стр.10, ауд.308.

E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин, ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.6); khabirovasophia@gmail.com (Хабирова С.Ю., соискатель)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3170>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

А.В. Северин

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Методы ядерной медицины с использованием современных радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) позволяют проводить раннюю диагностику и эффективное лечение онкологических заболеваний. Относительно новым и перспективным направлением исследований является разработка биосовместимых и нетоксичных наноматериалов, меченных радионуклидами. Наночастицы можно рассматривать как платформу для получения комбинированных многофункциональных радиофармпрепаратов, что является одним из путей для реализации персонализированной медицины. При этом физико-химические свойства самих наночастиц могут быть использованы для повышения эффективности диагностических и терапевтических характеристик препарата. Так, например, особенностью CeO_2 является способность инактивировать свободные активные формы кислорода (АФК) и долгоживущие активные формы белков, образующиеся при воздействии ионизирующего излучения РФЛП на организм, при этом в опухолевых клетках он проявляет прооксидантную активность, провоцируя гибель клеток. Однако, наночастицы CeO_2 на данный момент слабо изучены с точки зрения возможности применения в ядерной медицине, несмотря на потенциальный интерес к данному материалу. Магнитные наночастицы также могут применяться в медицине как в диагностике (в качестве контраста для МРТ) и терапии, а также магнитомеханической терапии. На основе наночастиц гексаферрита стронция могут быть получены стабильные коллоидные растворы, которые возможно применять в медицинских целях, а покрытие поверхности частиц тонким слоем диоксида кремния улучшит их биосовместимость и приведет к снижению цитотоксичности [1].

Выбор радионуклида является важным фактором для определения свойств потенциального препарата. Цинк и скандий имеют несколько изотопов, которые обладают подходящими ядерно-физическими свойствами для диагностики (^{62}Zn , ^{63}Zn , ^{43}Sc , ^{44}Sc) и терапии (^{47}Sc). В литературе имеются данные об относительно небольшом количестве соединений, содержащих эти радионуклиды, поэтому получение и исследование новых РФЛП на их основе является актуальной задачей. В последние годы в исследованиях высокую эффективность показала и таргетная альфа-терапия. Среди изотопов висмута выделяют два альфа-излучателя – ^{212}Bi (α , $T_{1/2} = 60,5$ мин) и ^{213}Bi (α , $T_{1/2} = 45,6$ мин), которые могут применяться для терапии различных типов опухолей. При этом для моделирования экспериментов удобнее использовать долгоживущие (^{65}Zn (ЭЗ, $T_{1/2} = 243,93$ д) и ^{207}Bi (ЭЗ, β^+ , $T_{1/2} = 31,5$ год)) или относительно легкодоступные (^{44}Sc (β^+ , $T_{1/2} = 3,93$ ч)) радионуклиды.

Радионуклид возможно связывать с поверхностью наночастиц прямым или косвенным путем. В первом случае радионуклид включается в ядро или оболочку частицы, что может привести к необратимым изменениям ее свойств. Поэтому гораздо чаще меченные радионуклидами наночастицы получают косвенным методом с использованием бифункциональных хелаторов, которые прививаются к наночастице и затем образуют устойчивое комплексное соединение с радионуклидом. Хелатирующий агент при этом

должен быстро связывать радионуклиды металлов в комплексы, которые не будут в последствии диссоциировать в условиях живого организма.

В настоящее время широко исследуются макроциклические лиганды для создания устойчивых конъюгатов. Лиганд DOTA является оптимальным хелатором для связывания большого ряда катионов металлов, в том числе и для исследуемых в данной работе Zn^{2+} , Sc^{3+} и Bi^{3+} . Азакраун-эфиры и их производные с шестью гетероатомами в цикле также образуют стабильные комплексные соединения за счет неподеленных электронных пар у атомов азота в макроцикле. Лиганд L1 ранее уже исследовался в нашей научной группе и продемонстрировал высокую скорость комплексообразования с Bi^{3+} и Zn^{2+} при комнатной температуре, а также кинетическую устойчивость $BiL1$ в биологических средах и в условиях *in vivo* [2,3].

Таким образом, в данной работе в качестве связующего агента между радионуклидом и наночастицей будут рассмотрены функциональный лиганд *p*-SCN-Bn-DOTA, макроциклический азакраун-лиганд L1 и его производное L2 (рис. 1).

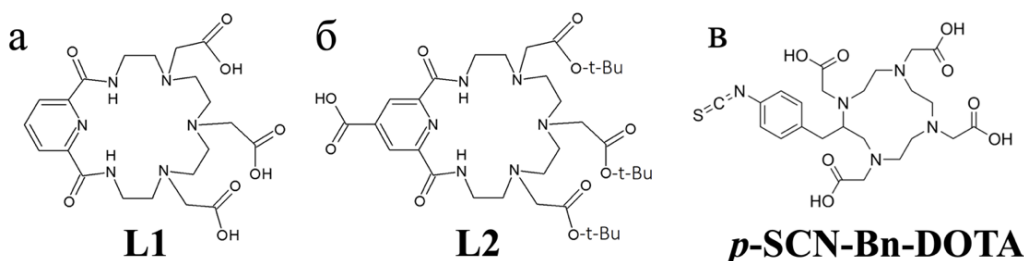


Рис. 1. а) Лиганд L1 и б) его производное L2; в) функциональный лиганд *p*-SCN-Bn-DOTA

Целью данной работы является разработка методики получения поверхностно-модифицированных азакраун-эфирами наночастиц диоксида церия и гексаферрита стронция и апробация полученных конъюгатов для использования в качестве платформ для радиофармпрепаратов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка методик функционализации поверхности наночастиц диоксида церия и гексаферрита стронция азакраун-лигандами L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA и изучение структурных особенностей и свойств поверхности исследуемых соединений.
2. Установление условий комплексообразования $[^{65}Zn]Zn^{2+}$, $[^{44}Sc]Sc^{3+}$, $[^{207}Bi]Bi^{3+}$ с конъюгатами наночастиц и L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA, сравнение сорбционной способности функционализированных и нефункционализированных наночастиц.
3. Анализ кинетической стабильности изучаемых комплексных соединений в биологически значимых средах.
4. Определение цитотоксичности полученных конъюгатов и изучение биораспределения и экскреции наиболее стабильных комплексных соединений в условиях живого организма.

Научная новизна

1. Разработаны новые методики химической модификации поверхности наночастиц SeO_2 и $SHF@SiO_2$ макроциклическими лигандами L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA.

2. Впервые показана кинетическая инертность меченных ^{44}Sc и ^{207}Bi конъюгатов наночастиц CeO_2 и SHF@SiO_2 и лиганда L2 в присутствии конкурирующих ионов и белков сыворотки крови.
3. Впервые установлено, что конъюгаты наночастиц $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2}$ и $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L2}$ не проявляют цитотоксичности по отношению к клеткам EA.hy926, что значимо для биомедицинского применения.
4. Впервые получены данные распределении конъюгатов наночастиц $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{44}\text{Sc}$ и $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L2-}^{207}\text{Bi}$ в условиях организма лабораторной мыши. Показано, что комплекс ^{207}Bi и конъюгата $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L2}$ устойчив *in vivo*.

Практическая и теоретическая значимость работы

Показана возможность получения новых конъюгатов наночастиц гексаферрита стронция и диоксида церия с бифункциональными производными азакраун-эфиров, а также определены их комплексообразующие свойства с радионуклидами и охарактеризована устойчивость в биологических средах и *in vivo*.

Результаты данной диссертационной работы показывают перспективность использования поверхностно-модифицированных наночастиц как потенциальных компонентов радиофармпрепарата. Данные об устойчивости полученных соединений и их распределении в организме могут быть полезны в дальнейших исследованиях аналогичных функционализированных наночастиц.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Модификация наночастиц CeO_2 и SHF@SiO_2 с помощью APTES позволяет в дальнейшем осуществить эффективную функционализацию поверхности с помощью азакраун-лигандов L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA для комплексообразования с ^{44}Sc , ^{65}Zn и ^{207}Bi
2. Конъюгаты $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2}$ и $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L2}$ образуют комплексы с ^{44}Sc и ^{207}Bi соответственно, которые являются кинетически стабильными в различных биологически значимых средах, в том числе и в сыворотке крови.
3. Комплексное соединение $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L2-}^{207}\text{Bi}$ демонстрирует отличное от свободного $^{207}\text{Bi}^{3+}$ биораспределение и устойчивость в условиях живого организма на начальном этапе эксперимента.

Личный вклад автора

На основании литературных данных автором было предложено использование диоксида церия и магнитных наночастиц гексаферрита стронция в качестве потенциальной платформы для создания радиофармпрепаратов. Автором были предложены и апробированы различные методики синтеза конъюгатов наночастиц CeO_2 и SHF@SiO_2 и азакраун-лигандов L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA. Исследование полученных структур

инструментальными методами анализа проводилось при активном участии автора. Обработка полученных данных проводилась лично автором. Автором было проведено выделение радионуклидов цинка и скандия из облученной мишени и генератора $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$, соответственно. Были установлены оптимальные условия комплексообразования конъюгатов с радионуклидами, подобраны концентрации катионов металлов и конъюгатов, а также температурные параметры синтеза. Проведены эксперименты по оценке устойчивости комплексных соединений в биологически значимых средах. Анализ цитотоксичности исследуемых конъюгатов проводился при непосредственном участии автора. Исследования полученных препаратов на лабораторных животных проводились автором работы.

Отдельные эксперименты проводились студентом М.А. Меньшиковым в рамках дипломной работ под руководством автора данной диссертационной работы.

Методология и методы исследования

В ходе работы был проведен синтез наночастиц CeO_2 методом химического осаждения аммиаком. Поверхность наночастиц CeO_2 и $\text{SHF}@/\text{SiO}_2$ первично модифицировалась линкерами 2-хлорметилоксиран (эпихлоргидрин, ECH) или (3-аминопропил)триэтоксисилан (APTES). Количество аминогрупп на поверхности определяли с помощью нингидринового теста с использованием спектрофотометра. Далее к наночастицам были привиты азакраун-лиганды L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA по реакции ацилирования, при необходимости на заключительной стадии снимали защитные *трет*-бутилы с карбоксильных групп по реакции с муравьиной кислотой.

Наночастицы CeO_2 и $\text{SHF}@/\text{SiO}_2$ и их конъюгаты были исследованы с использованием набора методов: просвечивающая электронная микроскопия с электронной дифракцией на выбранных участках, флуоресцентная спектроскопия рентгеновского поглощения с высокой разрешающей способностью, инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния, термогравиметрический анализ, совмещенный с масс-спектрометрией, измерения ζ -потенциала с помощью метода многоугольного динамического рассеяния света, зависимость намагниченности от напряженности магнитного поля для магнитотвердых образцов исследовали с помощью вибрационного магнитометра.

Радионуклид ^{65}Zn выделяли из медной мишени естественного изотопного состава методом колоночной хроматографии. Радионуклид ^{44}Sc элюировали из генератора $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ с использованием колонки с ионообменной смолой.

Условия комплексообразования и кинетическую устойчивость комплексных соединений определяли методами центрифугирования (для $[^{65}\text{Zn}]\text{Zn}^{2+}$ и $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$) или конкурирующей жидкостной экстракции (для $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$).

Цитотоксичность препаратов оценивали на клеточной линии EA.hy926 с помощью резазурина. Флуоресценцию измеряли на планшетном флуориметре.

Фармакокинетику $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$, $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ и комплексов конъюгата $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{44}\text{Sc}$ и $\text{SHF}@/\text{SiO}_2\text{-APTES-L2-}^{207}\text{Bi}$ на временных отрезках 1, 4, 6 и 24 часа. Эксперименты

проводили на мышах C57bl/6 и CD-1. Кинетику выведения катионов металлов и комплексных соединений определяли по данным метаболической камеры. Эвтаназию проводили в CO₂-камере или методом цервикальной дислокации.

Активность образцов измерялась на гамма-спектрометре.

В работе использовались современные методы исследования, полученные результаты воспроизводимы.

Достоверность результатов работы обеспечена воспроизводимостью методик синтеза образцов, использованием современных инструментальных методов исследования и подтверждается высокой сходимостью параллельных исследований и сравнением с холостым опытом.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.13 Радиохимия по ряду исследований: методы выделения, разделения и очистки радиоактивных элементов и изотопов; получение и идентификация меченных соединений; методы радиохимического анализа; метод радиоактивных индикаторов; химические аспекты использования радионуклидов в биологии и медицине.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: АПНХ-2020: материалы для генерации, преобразования и хранения энергии (Москва, Россия, 13-15 ноября 2020); 9th International Conference on Radiation in Various Fields of Research (Херцег-Нови, Черногория, 14-18 июня 2021), the XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 6-10 сентября 2021); 5-я Российская конференция МедХим-Россия 2021 (Волгоград, Россия, 16-19 мая 2022); 20th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals (Верона, Италия, 24-27 ноября 2022); 10th International Conference on Nuclear and Radiochemistry (Брайтон, Великобритания, 25-30 августа 2024).

Часть результатов была получена в рамках работы по проектам РФФИ 21-33-70023 и РНФ 21-73-00101.

Публикации

Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 13 печатных изданиях, 4 из которых статьи, изложенные в рецензируемых научных журналах, индексируемых международными базами данных (Web of Science и Scopus).

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, 3 глав и заключения. Полный объем диссертации составляет 122 страницы с 50 рисунками и 9 таблицами. Список литературы содержит 217 наименований.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи, показаны научная новизна и практическая значимость работы, перечислены основные положения, выносимые на защиту, показана апробация работы и указан личный вклад.

В обзоре литературы (глава 1) рассмотрены диагностические, терапевтические и тераностические методы ядерной медицины, возможность использования наночастиц диоксида церия и магнитных наночастиц гексаферрита стронция для медицинских целей. Приведены примеры радиофармпрепаратов на основе комплексов цинка, скандия и висмута, а также обсуждены хелатирующие агенты и векторы для адресной доставки препаратов.

Экспериментальная часть (глава 2) содержит описание используемых приборов и реактивов, в том числе наночастиц гексаферрита стронция, полученных в лаборатории неорганического материаловедения химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, и лигандов L1 и L2, синтезированных в ИНЭОС РАН (лаборатория фотоактивных и супрамолекулярных систем), методы выделения радионуклидов ^{65}Zn и ^{44}Sc , методики синтеза конъюгатов наночастиц, получение комплексных соединений и определение их стабильности в биологически значимых средах, а также условия проведения экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

В обсуждении результатов (глава 3) представлены данные о морфологии наночастиц диоксида кремния и гексаферрита стронция, охарактеризованы структуры их конъюгатов. Приведены условия образования меченых комплексных соединений с радионуклидами в водных растворах, а также стабильность в биологически значимых средах и цитотоксичность конъюгатов наночастиц, показано биораспределение соединений в органах лабораторной мыши и экскреция препарата на основе гексаферрита стронция.

1.1 Наночастицы диоксида церия

Синтез CeO_2 проводили при комнатной температуре и постоянном перемешивании методом химического осаждения $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ аммиаком. В результате образовывался желтый осадок диоксида церия.

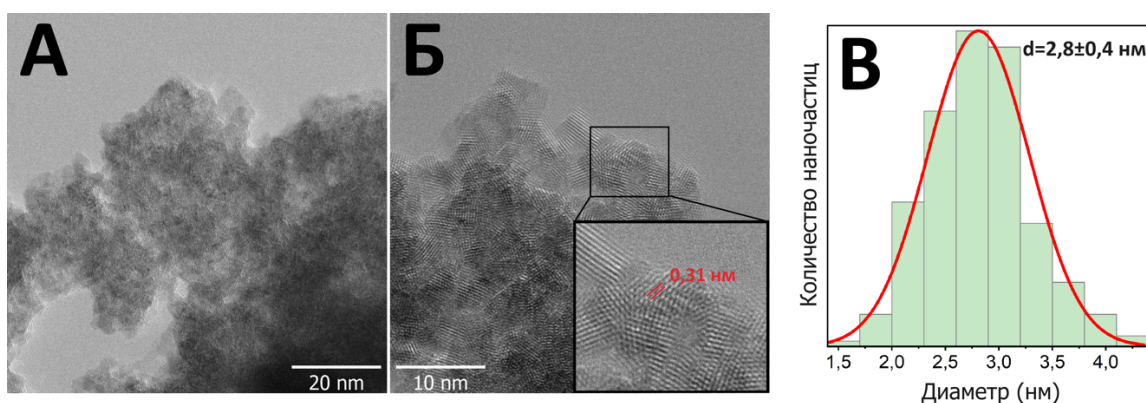


Рис. 2. а-б) Микрофотографии наночастиц CeO_2 ; в) гистограмма распределения наночастиц CeO_2 по диаметру, построенная из данных ПЭМ.

По результатам просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) было установлено, что в ходе синтеза образовались кристаллические наночастицы сферической формы. Диаметр частиц составил 2,8 нм (рис. 2). На микрофотографии наблюдаются полосы решетки сильно кристаллизованных частиц с расстоянием 0,31 нм, что соответствует плоскости (111) наночастиц CeO_2 .

1.2 Модификация поверхности наночастиц диоксида церия

Модификация поверхности наночастиц оксида церия (IV) лигандами L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA с предварительной прививкой линкеров эпихлоргидрина (I) и APTES (II) была осуществлена согласно схеме, представленной на рисунке 3.

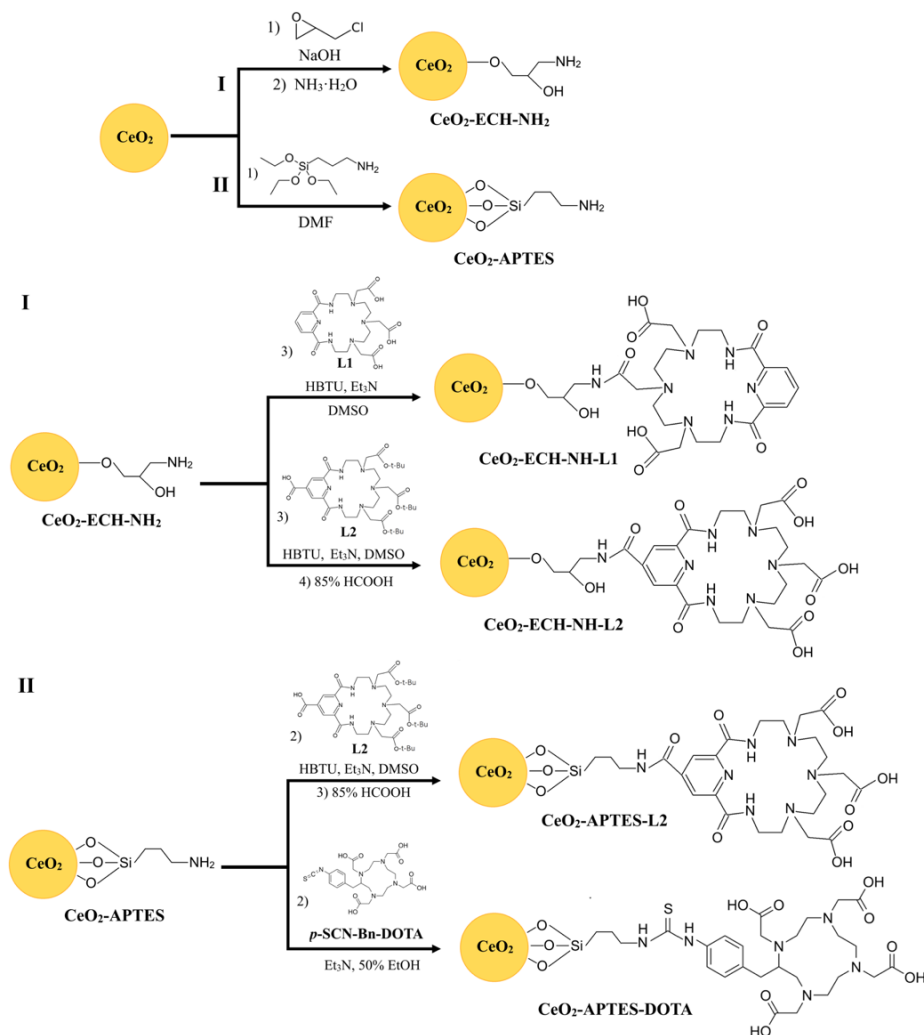


Рис. 3. Схема синтеза модифицированных наночастиц диоксида церия лигандами.

Исследование конъюгатов $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH}_2$ и лигандов L1 и L2

Структура полученных модифицированных наночастиц CeO_2 подтверждается методом ИК-спектроскопии (рис. 4а). Прослеживаются пики, характерные аминокруппе ($3500 - 3300$, 1110 см^{-1}), образовавшемуся вторичному амиду (1694 см^{-1}), колебания в пиридиновом кольце ($1567 - 1557$, 778 см^{-1}) и карбоксильных группах (1425 , 1403 см^{-1}) лигандов. Так как

все образцы состоят из кристаллических наночастиц CeO_2 размером 2,8 нм, в спектрах наблюдаются деформационные колебания Ce-O .

Эффективность связывания лиганда с поверхностью наночастиц церия оценивали методом термогравиметрического анализа в сочетании с масс-спектрометрией в атмосфере воздуха (рис. 4б). Потеря массы у конъюгатов $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L1}$ и $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2}$ заметно больше по сравнению с исходным CeO_2 , что является следствием присутствия лигандов на поверхности. Кроме того, наблюдается изменение угла наклона линий модифицированных образцов в начале нагрева, вызванное окислением органической составляющей материала.

Спектры комбинационного рассеяния наночастиц CeO_2 (рис. 4в) имеют основную колебательную моду F_{2g} при рамановском сдвиге около 453 см^{-1} , связанную с изменением длины связи Ce-O . Слабая полоса, наблюдаемая при 1050 см^{-1} , относится с асимметрией колебательную моды A_{1g} . В модифицированных образцах CeO_2 можно наблюдать наличие полосы около 600 см^{-1} , что может объяснять наличие кислородных вакансий, которое сопровождается восстановлением Ce^{4+} до Ce^{3+} на поверхности твердого вещества [4]. Более того, наличие колебаний связей в спектрах комбинационного рассеяния органических молекул подтверждает изменение структуры поверхности наночастиц диоксида церия.

Сравнение спектров КР модифицированного образца $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2}$ и чистого оксида церия (IV) выявило увеличение полуширины на полувысоте и смещение пика F_{2g} влево на $14,83\text{ см}^{-1}$ модифицированных частиц относительно спектра исходного CeO_2 (рис. 4г). Это связано с изменением поверхности CeO_2 [5] и подтверждает образование целевых образцов.

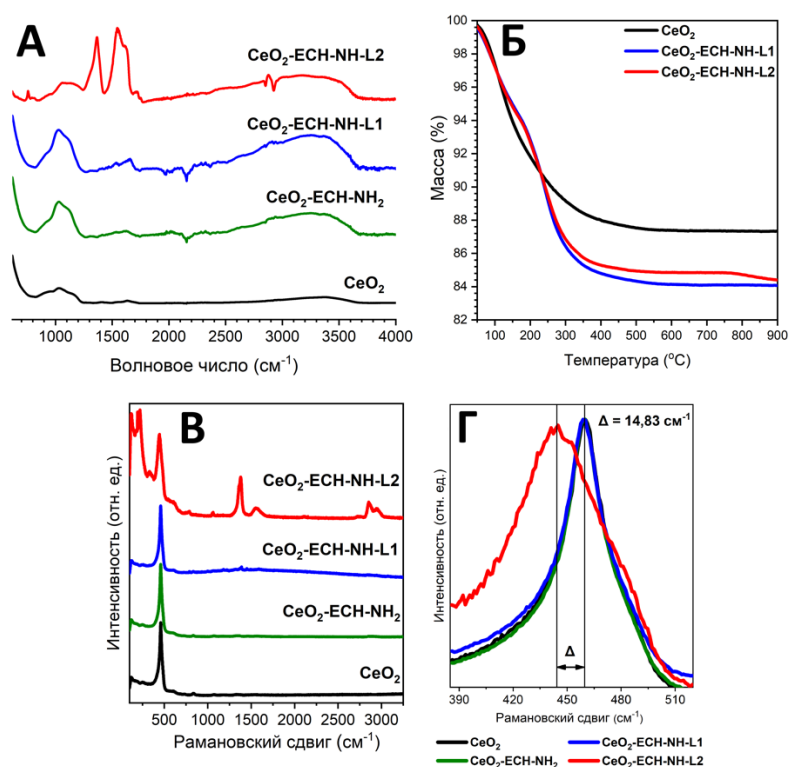


Рис. 4. Данные а) ИК-спектроскопии, б) ТГА и в-г) КР спектроскопии, полученные с образцов исходного CeO_2 , $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH}_2$ и модифицированной серии.

Исследование конъюгатов CeO₂-APTES и лигандов L2 и p-SCN-Bn-DOTA

В ИК-спектрах полосы деформации Ce–O (845, 940, 1060, 1340 см⁻¹) наблюдаются для всех образцов. Колебания групп R-NH₂ в областях 900 см⁻¹ и 1100 см⁻¹, а также связей Si–O (1072 см⁻¹) подтверждают образование структуры CeO₂-APTES. После функционализации были обнаружены пики, характерные для связи C–H в группе –CH₃ (2973 см⁻¹) и карбоксильных группах (1425, 1403 см⁻¹). В спектре CeO₂-APTES-L2 обнаружены полосы, характерные изменению длины связи C–H (740 см⁻¹) и C–N (1140 см⁻¹) в пиридине.

Кривые потери массы исходных и модифицированных образцов CeO₂ представлены на рисунке 5б. Наблюдается равномерная потеря массы в диапазоне от 50°C до 500°C. Характер кривых разложения конъюгатов наночастиц CeO₂-APTES-L2 и CeO₂-APTES-DOTA аналогичен характеру кривой разложения CeO₂-APTES, где наблюдались две стадии потери массы. Кроме того, наблюдается изменение угла наклона линий модифицированных образцов, вызванное окислением органической молекулы. Процент потери массы CeO₂-APTES-L2 и CeO₂-APTES-DOTA существенно выше относительно CeO₂ и CeO₂-APTES, что свидетельствует о прикреплении лигандов к поверхности наночастиц.

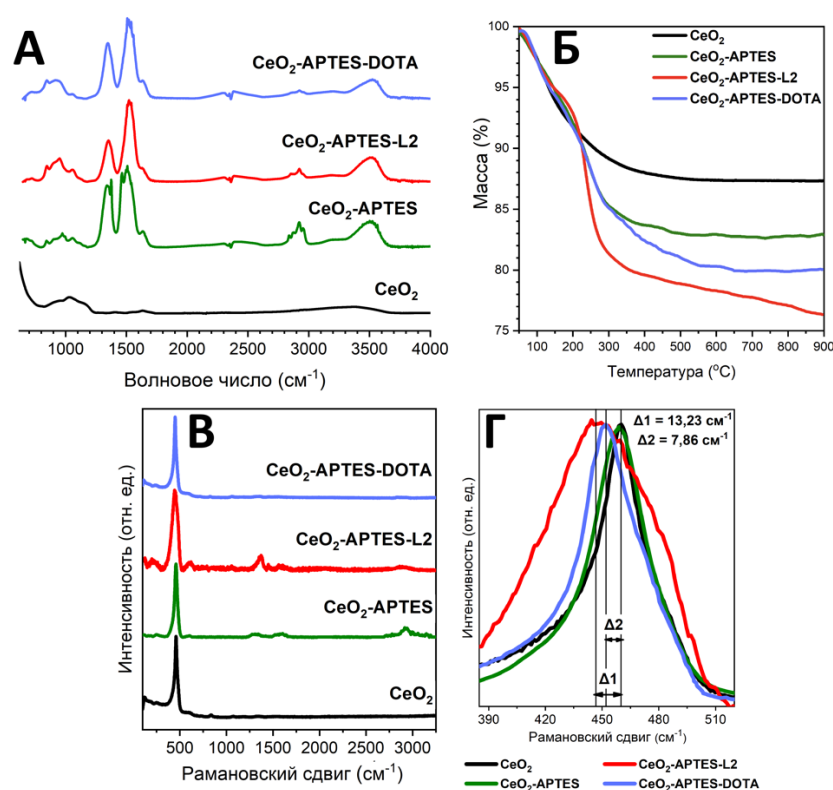


Рис. 5. Данные а) ИК-спектроскопии, б) ТГА и в-г) КР спектроскопии, полученные с образцов исходного CeO₂, CeO₂-APTES и модифицированной серии.

В рамановских спектрах (рис. 5в) для всех образцов наблюдался характерный пик 453 см⁻¹ ($\lambda = 633$ нм) относящийся к моде колебаний F_{2g} CeO₂. Данный факт подтверждает отсутствие изменений в кристаллической структуре диоксида церия на всех стадиях модификации наночастиц. В то же время наличие колебаний связей в спектрах комбинационного рассеяния органических молекул подтверждает изменение структуры

поверхности наночастиц диоксида церия. Изменение полуширины на полувысоте и смещение пика F_{2g} влево на $7,86 \text{ см}^{-1}$ и $13,23 \text{ см}^{-1}$ модифицированных образцов CeO_2 -APTES-DOTA и CeO_2 -APTES-L2 относительно исходного оксида церия (IV) (рис. 5г) связано с изменениями на поверхности CeO_2 [5] и подтверждает образование целевых образцов.

1.3 Определение условий мечения конъюгатов наночастиц CeO_2

Для дальнейших исследований необходимо подобрать концентрацию лиганда и катиона металла, при которых будет достигается высокая радиохимическая чистота. Так как катион Bi^{3+} в нейтральной и щелочных средах гидролизуется, образуя нерастворимые соединения, определение условий мечения проводили в кислой среде при pH 3 методом конкурирующей жидкостной экстракции несвязанного в комплекс Bi^{3+} с добавлением носителя. Исследования условий мечения $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ и $[^{65}\text{Zn}]\text{Zn}^{2+}$ конъюгатов CeO_2 -APTES-L2 и CeO_2 -APTES-DOTA проводили с помощью разделения меченых наночастиц от маточного раствора центрифугированием и измерением активности надосадочной жидкости на гамма-спектрометре.

Исследование конъюгатов CeO_2 -ECH-NH₂ и лигандов L1 и L2

При анализе данных (рис. 6) сделан вывод, что при концентрации 10^{-3} г/л CeO_2 -ECH-NH-L1 и $c(\text{Bi}^{3+}) = 10^{-9} \text{ М}$ радиохимическая чистота (РХЧ) не превышает 65% из-за неселективного связывания лиганда L1 с линкером в процессе синтеза конъюгата. Такой результат не позволяет рассматривать данное комплексное соединение как потенциальный радиофармпрепарат, поскольку полученное значение существенно ниже критического значения радиохимической частоты РФЛП. В то же время, для комплекса висмута с CeO_2 -ECH-NH-L2 степень связывания 93% при аналогичных условиях, что делает целесообразным их дальнейшие исследования в биологических средах.

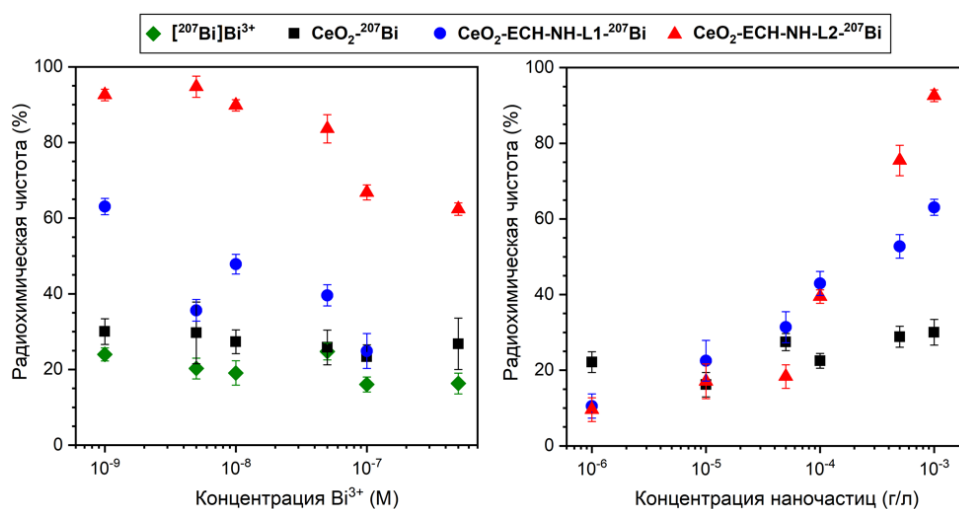


Рис. 6. Зависимости РХЧ от концентрации катиона $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ при фиксированном количестве наночастиц (10^{-3} г/л) и РХЧ от концентрации наночастиц при постоянной концентрации катиона висмута (10^{-9} М).

Исследование конъюгатов CeO₂-APTES и лигандов L2 и p-SCN-Bn-DOTA

Комплексообразование с цинком, висмутом и скандием проходит при нагревании до 90°C в течение 30 минут. Результаты экспериментов (рис. 7) показывают, что повышение радиохимической чистоты происходит при одновременном снижении концентрации катионов металлов в системах. Из полученных зависимостей можно сделать вывод, что наибольший радиохимический выход достигается при концентрации катионов 10⁻⁹ М для комплексов CeO₂-APTES-L2 и CeO₂-APTES-DOTA с [⁶⁵Zn]Zn²⁺, [⁴⁴Sc]Sc³⁺ и [²⁰⁷Bi]Bi³⁺ (процент меченых конъюгатов в растворе достигает 74% для CeO₂-APTES-DOTA-⁴⁴Sc и более 89% для остальных исследуемых комплексных соединений). При этом данные концентрации конъюгатов и катионов металлов приемлемы для использования в радиофармпрепаратах.

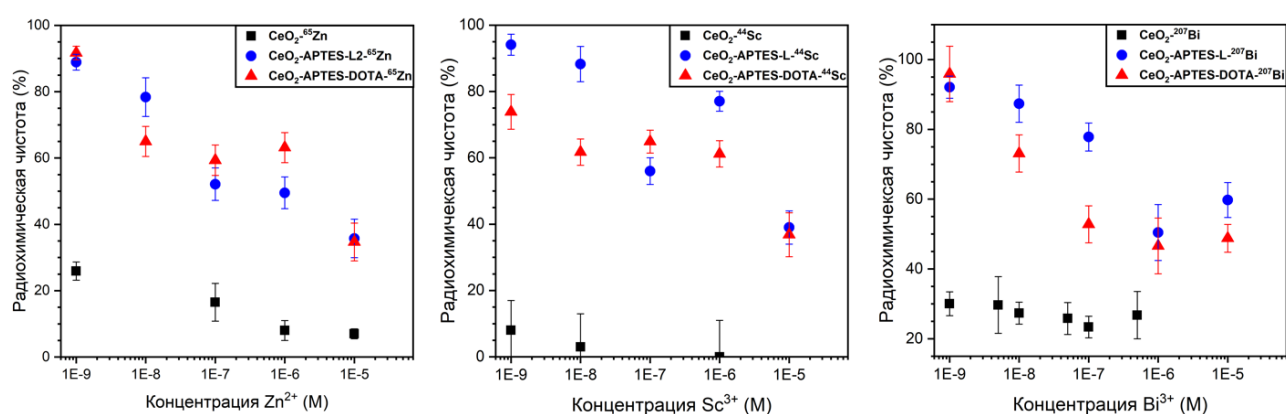


Рис. 7. Зависимости радиохимической чистоты от концентрации катионов [⁶⁵Zn]Zn²⁺, [⁴⁴Sc]Sc³⁺ и [²⁰⁷Bi]Bi³⁺ при фиксированном количестве CeO₂ и его поверхностно-модифицированной серии (0,1 г/л).

1.4 Устойчивость комплексных соединений в биологически значимых средах

Устойчивость комплексов конъюгатов наночастиц с катионами скандия, цинка и висмута изучали в биологически значимых средах – физиологическом растворе (0,9% NaCl), фосфатно-солевом буфере (PBS) с pH 7,4 и бычьей эмбриональной сыворотке (FBS) в соотношении 1:9. Этот эксперимент может частично смоделировать поведение потенциального радиофармпрепарата в живом организме на начальном этапе непосредственно после введения препарата. Диссоциация комплекса в этих условиях является весьма вероятным процессом из-за большого количества конкурирующих ионов и сывороточных белков, которые способны перехелатировать катионы радионуклидов.

Комплексные соединения с радионуклидом скандия выдерживали в биологических средах не более 10 ч в связи с относительно быстрым периодом полураспада ⁴⁴Sc (T_{1/2} = 3,9 часа), для остальных образцов эксперимент проводили в течение суток.

Исследование конъюгатов CeO₂-ECH-NH₂ и лигандов L1 и L2

На рисунке 8 показана РХЧ препарата от времени термостатирования в биологически значимых средах при непрерывном перемешивании. В результате перехелатирования [²⁰⁷Bi]Bi³⁺ в растворе радиохимическая чистота через сутки от начала эксперимента не превышает 85% в физиологическом растворе и фосфатном буфере.

Была проанализирована кинетическая устойчивость комплекса $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2-}^{207}\text{Bi}$ в FBS (соотношение 1:9). Как показано на рисунке 8, количество связанного в комплекс катиона висмута не превышает 25% через 24 часа.

Таким образом, комплексное соединение $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2-}^{207}\text{Bi}$ не будет рассматриваться как возможный радиофармпрепарат и изучаться в условиях *in vitro* и *in vivo*. Однако, сам конъюгат $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2}$ представляет интерес для дальнейших исследований как платформа для мечения другими радионуклидами.

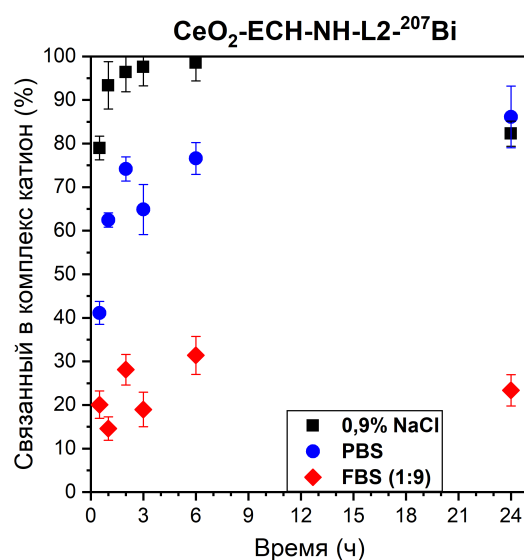


Рис. 8. Зависимость доли связанного в комплекс катиона висмута от времени термостатирования комплексного соединения $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2-}^{207}\text{Bi}$ в биологически значимых средах.

Исследование конъюгатов $\text{CeO}_2\text{-APTES}$ и лигандов L1, L2 и $p\text{-SCN-Bn-DOTA}$

Комплексы с $^{65}\text{Zn}[\text{Zn}^{2+}]$ в 0,9% растворе NaCl характеризуются незначительной диссоциацией в зависимости от времени (рис. 9). По истечении 24 часов % связанного в комплекс катиона цинка снижается не более чем на 10%, что обусловлено присутствием в растворе конкурирующих ионов. В то же время, $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{44}\text{Sc}$ и $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{44}\text{Sc}$ демонстрируют стабильность в течение 10 часов инкубации при 37°C, комплексы $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{207}\text{Bi}$ и $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{207}\text{Bi}$ также не распадаются в физиологическом растворе через сутки (выходы радиоактивной метки составляет более 90%). Результаты экспериментов показывают высокую кинетическую стабильность всех исследованных комплексов в течение 24 часов и в PBS.

В эмбриональной бычьей сыворотке (рис. 9) полученные комплексы $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{65}\text{Zn}$ и $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{65}\text{Zn}$ не показывают высокой стабильности. При этом % комплекса конъюгата $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2}$ не меняется через сутки после начала эксперимента и остается на уровне 40%, а $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{65}\text{Zn}$ диссоциирует на 10% в течение первых трех часов от начала эксперимента (количество $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{65}\text{Zn}$ в среде через 24 часа составляет примерно 40%). Образцы с $^{44}\text{Sc}[\text{Sc}^{3+}]$ оказались наиболее стабильными. На рисунке 8 показано, что комплекс скандия с $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2}$ значительно более стабилен в сыворотке крови, чем $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA}$: выход радиоактивной метки после 8 часов термостатирования составляет 86% и 74% соответственно. Количество $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{207}\text{Bi}$ в среде не превышает 45% и 15% для $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{207}\text{Bi}$ через 24 часа после начала эксперимента.

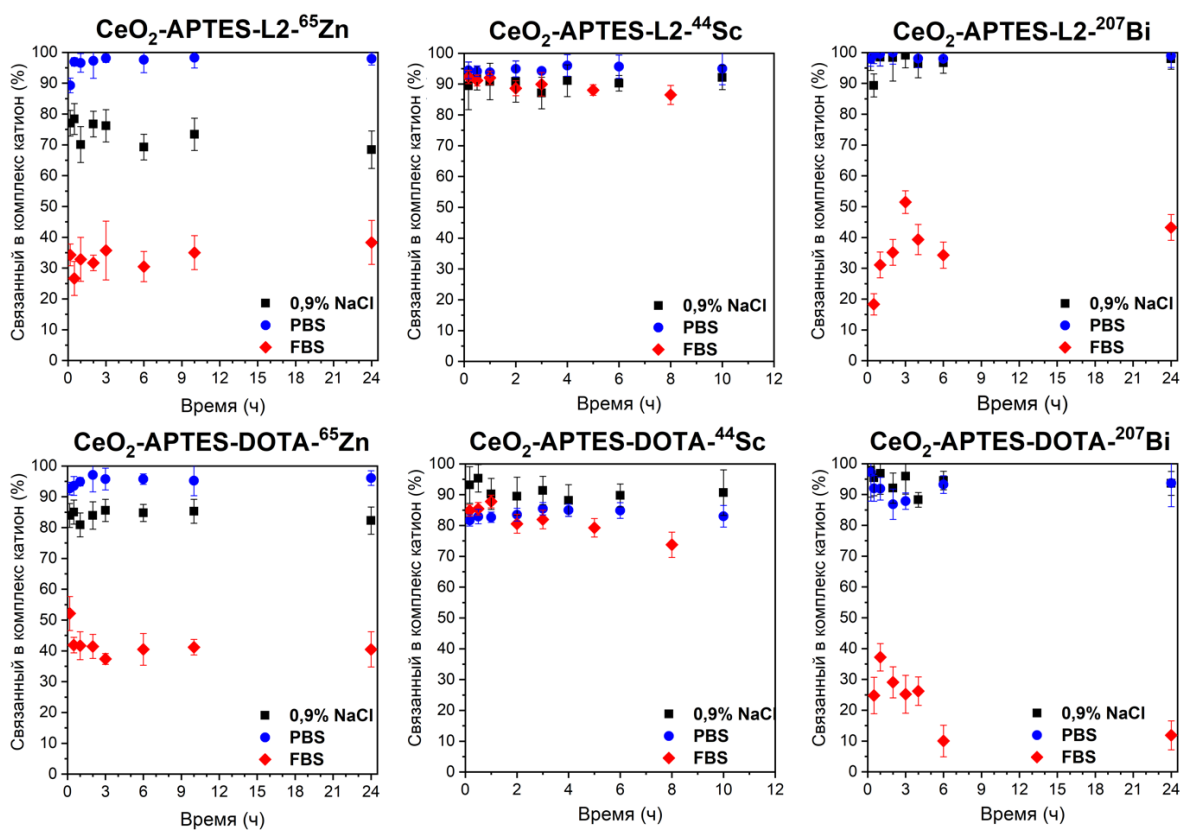


Рис. 9. Зависимость % связанного в комплекс катиона от времени термостатирования комплексов конъюгатов наночастиц CeO_2 и катионов $[^{65}\text{Zn}]\text{Zn}^{2+}$, $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ и $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ в биологических средах.

Исходя из представленных выше данных по устойчивости меченых конъюгатов наночастиц CeO_2 в эмбриональной бычьей сыворотке, в *in vitro* и *in vivo* условиях в дальнейшем будет рассматриваться наиболее стабильное соединение, имеющие потенциал для применения в радиофармпрепаратах – $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{44}\text{Sc}$.

1.5 *In vitro* и *in vivo* эксперименты

Жизнеспособность клеток оценивали на клеточной линии EA.hy926 (гибридная линия, полученная путем слияния эпителиальных клеток аденокарциномы легкого человека A549 с эндотелиальными клетками пупочной вены человека HUVEC) с помощью резазурина, который восстанавливается до флуоресцентного резорфурина благодаря метаболической активности клеток.

При концентрациях CeO_2 и $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2}$ 0,01, 0,1 и 0,3 г/л не наблюдается различий в жизнеспособности клеток по сравнению с контролем после 24 часов инкубации (рис. 10а). Жизнеспособность клеток во всех исследованных образцах превышает 99,5%. Цитотоксичность конъюгата находится в пределах погрешности аналогичного значения для оксида церия. Полученные результаты на цитотоксичность подтвердили возможность проведения *in vivo* эксперимента для комплекса $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{44}\text{Sc}$.

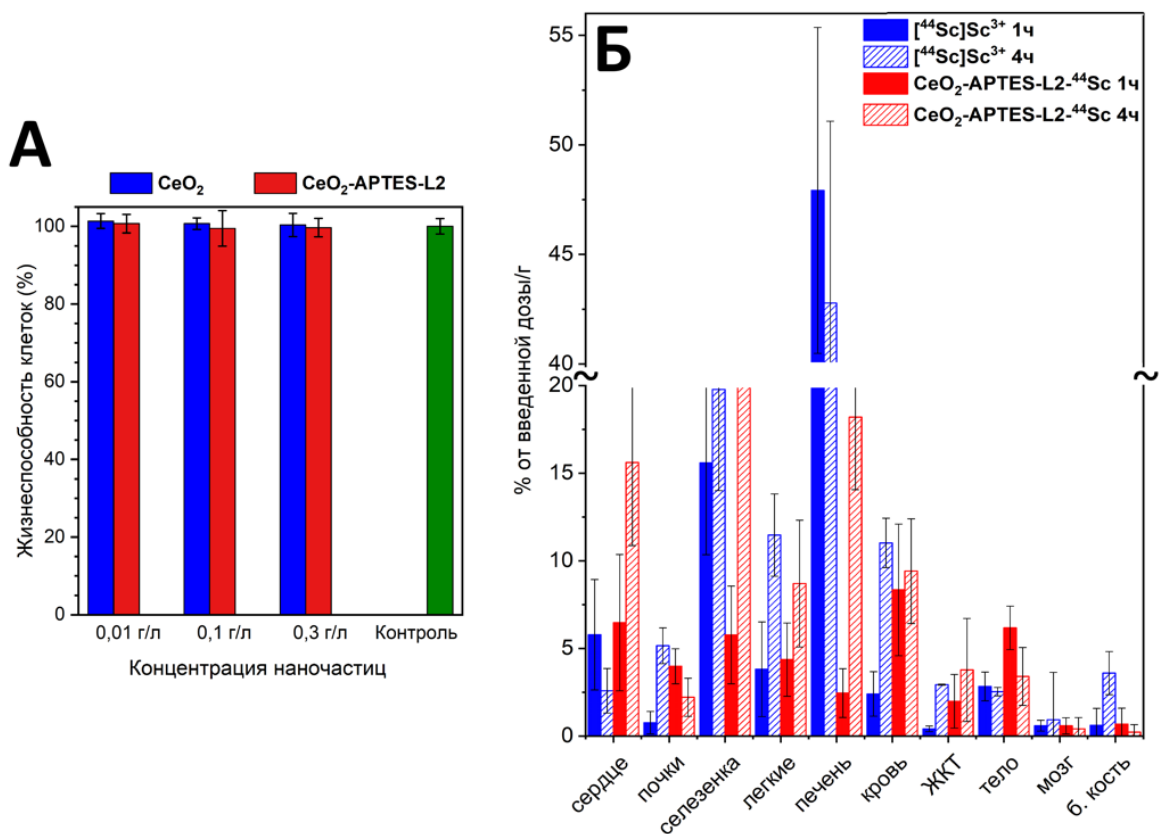


Рис. 10. а) Жизнеспособность клеток EA.hy926 после воздействия CeO₂ и CeO₂-APTES-L2; б) биораспределение свободного катиона [⁴⁴Sc]Sc³⁺ и соединения CeO₂-APTES-L2-⁴⁴Sc в различных органах лабораторных мышей через 1 и 4 часа после инъекции.

На гистограмме (рис. 10б) показаны данные о биологическом распределении комплексного соединения CeO₂-APTES-L2-⁴⁴Sc в органах лабораторной мыши через 1 и 4 часа после инъекции в сравнении с [⁴⁴Sc]Sc(CH₃COO)₃ (свободный катион [⁴⁴Sc]Sc³⁺).

Из представленных результатов следует, что [⁴⁴Sc]Sc³⁺ накапливается в большом количестве в печени (48 %/г) и селезенке (16 %/г) через 1 час после введения препарата. Стоит отметить, увеличение радиоактивности в селезенке прослеживается и спустя 4 часа после инъекции. Это объясняется связыванием катиона с белками и аминокислотами с последующим поглощением ретикулоэндотелиальной системой. Также [⁴⁴Sc]Sc³⁺ может проникать в клетки паренхимы печени [6]. Более того, наблюдается резкое увеличение концентрации [⁴⁴Sc]Sc³⁺ с 4 %/г до 11 %/г в легких мыши.

Распределение комплекса CeO₂-APTES-L2-⁴⁴Sc отличается от данных свободного катиона [⁴⁴Sc]Sc³⁺. Через 1 и 4 часа после инъекции наблюдается довольно высокая концентрация комплекса в крови (8 – 9 %/г). Также, повышается % введенной доза на грамм органа в сердце (16 %/г), селезенке (20 %/г), легких (9 %/г) и печени (19 %/г) спустя 4 часа после внутривенного введения комплексного соединения. В литературе [7] утверждают, что такой эффект характерен для наночастиц.

Незначительный процент накопления в почках (не более 5 %/г для всех изучаемых точек) указывает на низкую степень выведения [⁴⁴Sc]Sc³⁺ и CeO₂-APTES-L2-⁴⁴Sc в течение как минимум 4 часов. Концентрация [⁴⁴Sc]Sc(CH₃COO)₃ в крови за время эксперимента

увеличилась, что может быть связано с образованием коллоида и его медленным выведением из кровотока.

Полученные результаты не позволяют сделать однозначный вывод об устойчивости комплекса $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{44}\text{Sc}$ в условиях *in vivo*.

2.1 Наночастиц гексаферрита стронция

Наночастицы гексаферрита стронция, покрытые тонким аморфным слоем диоксида кремния (SHF@SiO_2), были синтезированы в научно-исследовательской лаборатории неорганического материаловедения из стеклокерамики с последующим кислотным гидролизом силикатов в присутствии частиц.

Согласно полученным данным наночастицы имеют пластинчатую форму со средним диаметром 40 нм и толщиной 5 нм (рис. 11).

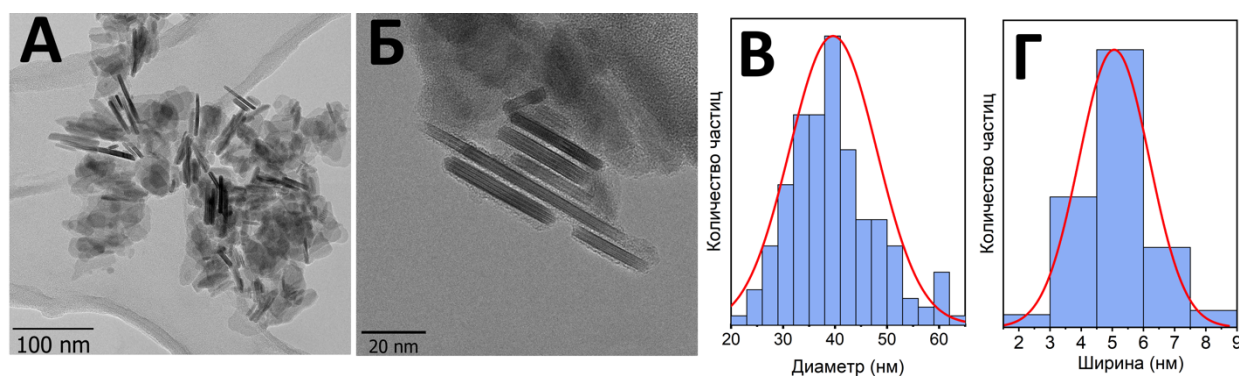


Рис. 11. а-б) Микрофотографии образца гексаферрита стронция, покрытого тонким слоем диоксида кремния; в-г) гистограммы распределения наночастиц по диаметру и ширине, построенные из результатов ПЭМ.

2.2 Модификация поверхности наночастиц гексаферрита стронция

Функционализация наночастиц гексаферрита стронция, покрытых диоксидом кремния, проводилась по схеме представленной на рис. 12.

Структура полученных модифицированных наночастиц гексаферрита стронция была изучена методом ИК спектроскопии (рис. 13а). В качестве образца сравнения был взят порошок SHF@SiO_2 размером 40·5 нм. Так как все образцы получены из исходных наночастиц, в спектрах наблюдаются валентные движения Fe–O в связях Si–O–Fe, а также колебания Si–O–Si и Si–O–H. В то же время, прослеживаются пики, характерные аминокруппе (3500 – 3300, 1160 cm^{-1}), образовавшемуся вторичному амиду (1656 cm^{-1}), колебания в пиридиновом кольце (1567 – 1557 cm^{-1}) и карбоксильных группах (1425 cm^{-1}) лигандов L1 и L2, а также валентные колебания связи C=S (1150 cm^{-1}) у конъюгата $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-DOTA}$.

Эффективность связывания лиганда с поверхностью наночастиц гексаферрита стронция оценивали с помощью термогравиметрического анализа (ТГА) в атмосфере воздуха (рис. 13б). Потеря массы происходит равномерно в диапазоне от 30°C до 500°C. Кривые функционализированных наночастиц находятся ниже кривой SHF@SiO_2 при

температуре от 400°C до 900°C, что является следствием присутствия лигандов на поверхности. Кроме того, в начале нагрева наблюдается изменение угла наклона линий модифицированных образцов, вызванное окислением органической части.

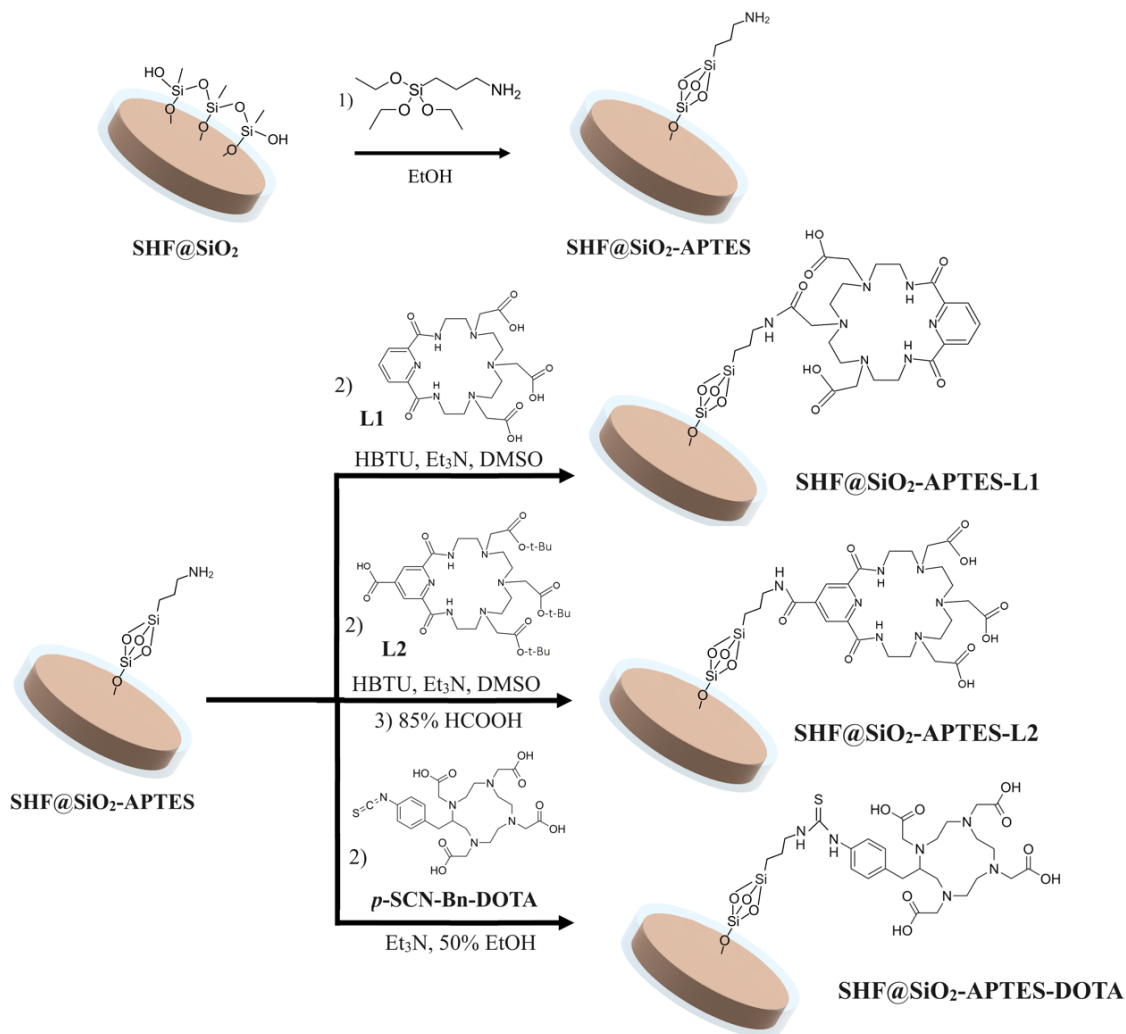


Рис. 12. Схема синтеза модифицированных наночастиц гексаферрита стронция, покрытых диоксида кремния.

На рисунке 13в показаны спектры комбинационного рассеяния света синтезированных функционализированных наночастиц SHF@SiO₂. Согласно теории групп, гексаферрит SrM соответствует 42 комбинационно-активным модам (11A_{1g}, 14E_{1g} и 17E_{2g}) [8]. В полученных нами спектрах комбинационного рассеяния присутствуют пять мод: E_{2g} (330 см⁻¹), E_{1g} (530 см⁻¹) и A_{1g} (680, 618 и 410 см⁻¹), которые указывают на образование фазы феррита стронция. Более того, наличие колебаний связей в органических молекулах на спектрах комбинационного рассеяния света подтверждает изменение структуры поверхности наночастиц. Полосы в спектрах комбинационного рассеяния света будут смещаться с изменениями на поверхности кристалла. Изменение полуширины на половину высоты и смещение максимума пика A_{1g} (680 см⁻¹) на 5,13 см⁻¹ (SHF@SiO₂-APTES-L1) и 10,83 см⁻¹ (SHF@SiO₂-APTES-L2 и SHF@SiO₂-APTES-DOTA) относительно исходного SHF@SiO₂ показано на рис. 13г. Исходя из вышесказанного можно сделать вывод об изменении поверхности наночастиц, что подтверждает изменение структуры веществ.

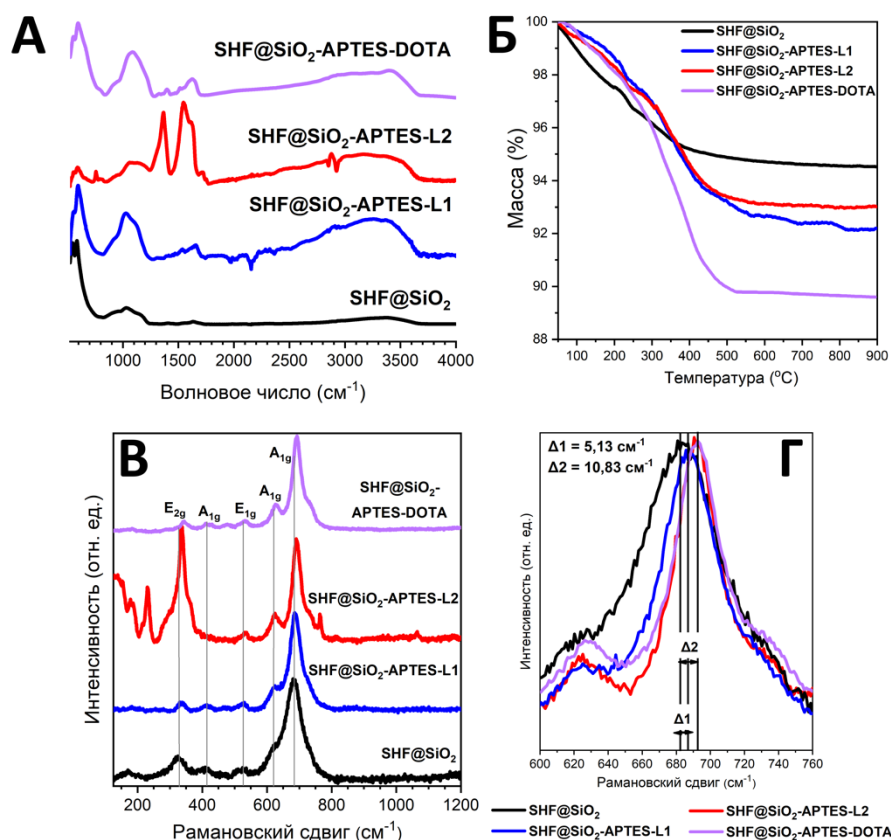


Рис. 13. Данные а) ИК-спектроскопии, б) ТГА и в-г) КР спектроскопии исходных и поверхностно-модифицированных наночастиц SHF@SiO₂.

2.3 Определение условий мечения конъюгатов наночастиц гексаферрита стронция

Для комплексов $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ с конъюгатом наночастиц и лигандами L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA методом конкурирующей жидкостной экстракции проводили анализ зависимости радиохимической чистоты от концентрации висмута (рис. 14). Мечение конъюгата SHF@SiO₂-APTES-DOTA изучали при комнатной температуре и нагревании в течение 30 минут до 50°C, 75°C и 90°C (рис. 14б).

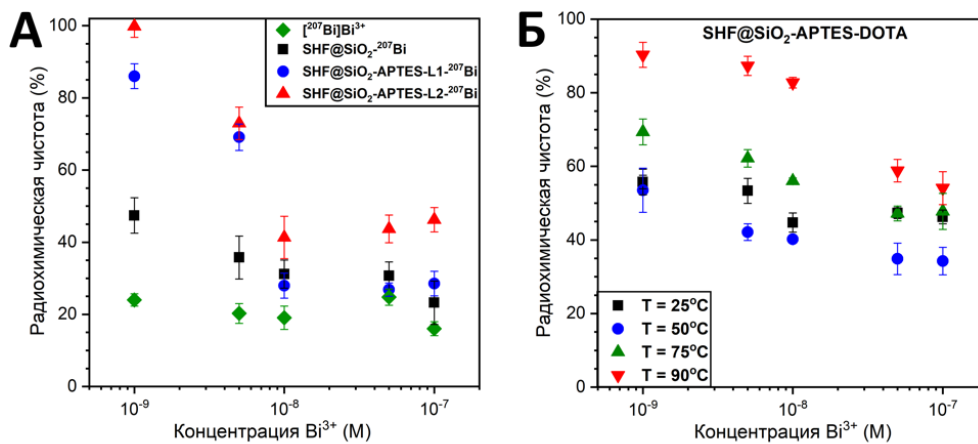


Рис. 14. а) Зависимости РХЧ от концентрации катиона $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ при фиксированных концентрациях SHF@SiO₂ и его поверхностно-модифицированной серии (10⁻³ г/л); б) Зависимости РХЧ от концентрации катиона $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ при концентрациях SHF@SiO₂-APTES-DOTA 10⁻³ г/л в различных температурных условиях.

Согласно полученным результатам оптимальная концентрация Bi^{3+} для образования комплексного соединения с конъюгатами наночастиц SHF@SiO₂-APTES-L1, SHF@SiO₂-APTES-L2 и SHF@SiO₂-APTES-DOTA — 10⁻⁹ М (радиохимическая чистота равна 86% для L1 и 99% для L2 (рис. 14a)). Увеличивается выход мечения при нагревании комплекса SHF@SiO₂-APTES-DOTA-²⁰⁷Bi: выдерживание в течение 30 минут при температуре 90°C приводит повышению РХЧ до 90%.

Таким образом, в данном исследовании были определены условия образования комплексов с высоким значением РХЧ, соответственно SHF@SiO₂-APTES-L1-²⁰⁷Bi, SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi и SHF@SiO₂-APTES-DOTA-²⁰⁷Bi могут в дальнейшем изучаться для возможного применения в радиофармпрепаратах.

2.4 Устойчивость комплексных соединений в биологически значимых средах

На рисунке 15 показана зависимость процента связанного в комплекс катиона от времени инкубирования при температуре 37°C и непрерывном перемешивании в следующих средах: 0,9 % NaCl; PBS; FBS в соотношении 1:9.

Полученные кинетические зависимости говорят о стабильности комплексных соединений в течение суток в 0,9% NaCl, что объясняется отсутствием перехелатирования $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ в данном растворе. В PBS SHF@SiO₂-APTES-L1-²⁰⁷Bi, SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi и SHF@SiO₂-APTES-DOTA-²⁰⁷Bi также стабильны в течение длительного времени, однако частичная диссоциация и относительно медленное образование структуры наночастица-лиганд-радионуклид для SHF@SiO₂-APTES-L1-²⁰⁷Bi может быть вызвано присутствием фосфат-ионов в буферном растворе.

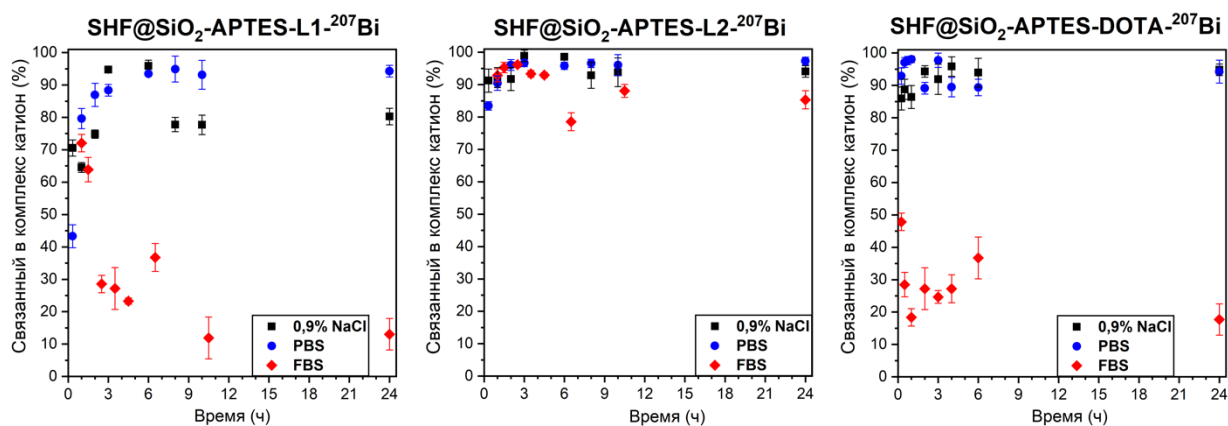


Рис. 15. Зависимость % связанного в комплекс катиона металла от времени термостатирования, характеризующая кинетическую стабильность комплексов SHF@SiO₂-APTES-L1-²⁰⁷Bi, SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi и SHF@SiO₂-APTES-DOTA-²⁰⁷Bi в биологически значимых средах.

Как показано, в сыворотке крови $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ остается связанным с конъюгатами наночастиц SHF@SiO₂ на протяжении всего эксперимента. Однако сравнение показывает, что комплекс висмута с SHF@SiO₂-APTES-L2 значительно более стабилен в сыворотке, чем комплексные соединения с SHF@SiO₂-APTES-L1 и SHF@SiO₂-APTES-DOTA: доля связанного в комплекс висмута через 24 часа термостатирования составляет 85% для

SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi, в то время как для SHF@SiO₂-APTES-L1 и SHF@SiO₂-APTES-DOТА не превышает 20% на момент окончания эксперимента.

Существенное различие результатов для комплексов с L1 и L2 связано со структурой лигандов и селективностью реакции ацилирования. Ранее было показано, что для образования стабильного соединения Bi³⁺ должен располагаться в макроциклической полости и координирован тремя карбоксильными группами макроцикла [2]. Таким образом, для координации Bi³⁺ комплекса необходимы по меньшей мере три COO⁻ группы. L1 имеет три незащищенные карбоксильные группы, которые участвуют в образовании связи линкер-лиганд, соответственно, они не могут прочно удерживать катион в макроциклической полости.

2.5 *In vitro* и *in vivo* эксперименты

Жизнеспособность гибридной клеточной линии EA.hy926 после воздействия SHF@SiO₂-APTES-L2 оценивали с помощью резазуринового теста в концентрациях конъюгата наночастиц от 0,001 г/л до 0,1 г/л. Значения на рисунке 16а приведены как средние результатов девяти независимых экспериментов.

При оптимальном для мечения количестве SHF@SiO₂-APTES-L2 – 10⁻³ г/л, не наблюдается различий в жизнеспособности клеток по сравнению с контрольной группой после 24 часов инкубации. Стоит отметить, что увеличение концентрации SHF@SiO₂-APTES-L2 на два порядка не приводит к увеличению цитотоксичности. Жизнеспособность клеток во всех исследованных образцах превышает 99%. Полученные данные позволяют продолжить исследования образца в условиях живого организма.

Для анализа стабильности комплекса SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi *in vivo* было изучено его биораспределение у мышей в сравнении с ²⁰⁷BiEDTA (свободный катион [²⁰⁷Bi]Bi³⁺). Биораспределение (рис. 16б), меченного висмутом конъюгата наночастиц SHF@SiO₂ показал накопление в печени, легких и селезенке через 1 ч после инъекции. Более того, через 24 часа наблюдалось значительное увеличение радиоактивности в этих органах, что специфично для наночастиц [7]. В то же время авторы статьи [2] утверждают, что комплекс L2-²⁰⁷Bi, не содержащий наночастиц, быстро выводился из легких и селезенки и демонстрировал более высокий уровень радиоактивности в почках по сравнению с другими органами. Только 15 %/г ²⁰⁷Bi от введенного SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi было обнаружено в почках через 1 ч после инъекции, в то время как для свободного [²⁰⁷Bi]Bi³⁺ это значение составляет более 55 %/г. При этом, через сутки после внутривенного введения препарата ²⁰⁷BiEDTA его содержание в почках снижается до 6%/г. Более того, наблюдается незначительное снижение радиоактивности в почках для комплексного соединения, что говорит о медленном выведении препарата из живого организма.

Стоит отметить, что в крови было обнаружено относительно небольшое количество ²⁰⁷Bi после введения меченых частиц по сравнению со свободным катионом висмута –

наибольшее количество $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ составило 1,3 %/г от введенной дозы через 1 ч после инъекции.

Для того, чтобы оценить экскрецию и период полувыведения препарата SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi из организма лабораторной мыши мочу и фекалии мышей собирали с помощью метаболической камеры каждый час в течение одних суток после инъекций. Процент экскреции от времени после внутривенной инъекции введения показан на рисунке 16в.

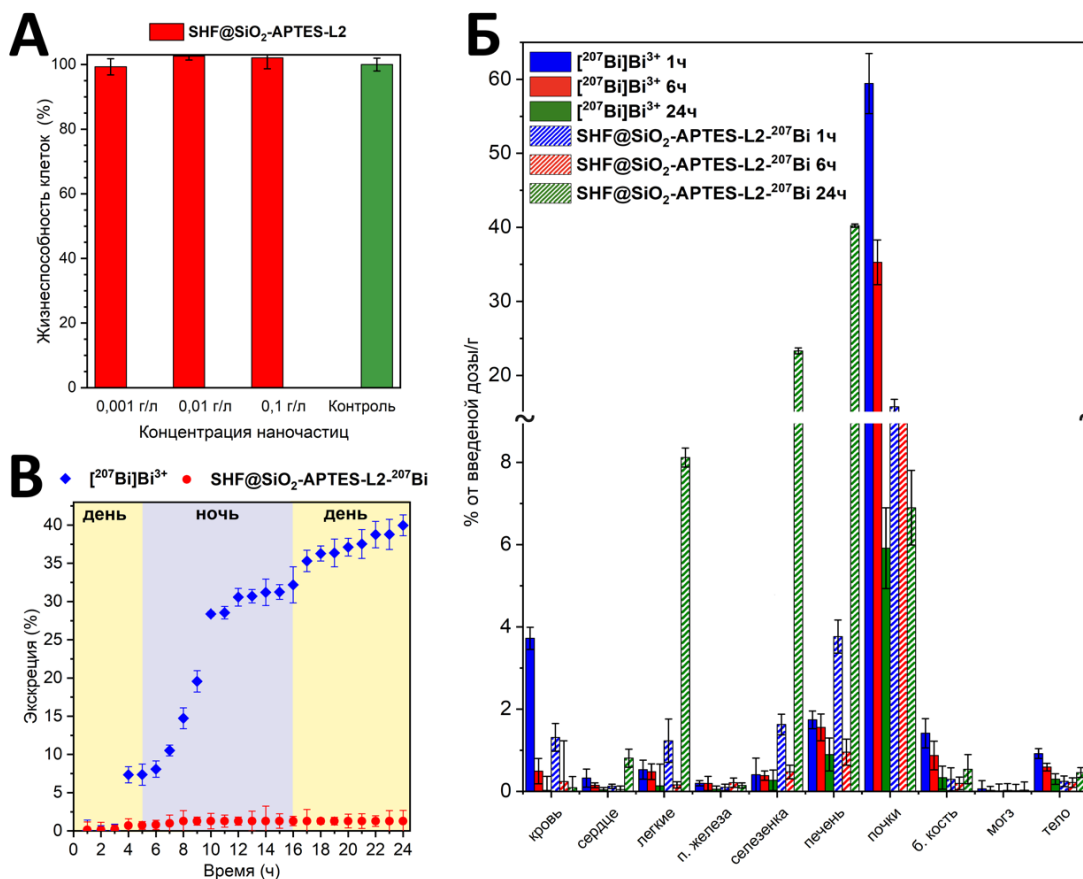


Рис. 16. а) Жизнеспособность клеток EA.hy926 после воздействия SHF@SiO₂-APTES-L2 через 24 часа от начала инкубации; б) биораспределение соединений, меченных ²⁰⁷Bi, в различных органах организма лабораторных мышей через 1, 6 и 24 часа после инъекции; в) процент экскреции от времени после внутривенной инъекции введения ²⁰⁷BiEDTA и SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi.

Количественный анализ показал, что через 24 часа после введения $[^{207}\text{Bi}]\text{BiEDTA}$ 40% свободного катиона висмута от исходного количества препарата вывелось с мочой и фекалиями, а период полувыведения составил 28,3 часа. В то же время, по окончании эксперимента всего 1,3% ²⁰⁷Bi от введенного количества выделилось после инъекции SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi. Это можно объяснить полным удержанием меченных наночастиц в организме лабораторной мыши. Вероятно, процент экскреции висмута в данном случае связан с незначительным количеством свободного катиона $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ в препарате (перед инъекцией радиохимическая чистота SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi составляла 95%) и медленной диссоциацией комплекса в условиях *in vivo*.

По результатам *in vivo* эксперимента можно сделать вывод, что соединение SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi стабильно в условиях живого организма как минимум на начальном этапе

эксперимента, так как в случае диссоциации высвобожденные катионы висмута имели бы профиль биораспределения, аналогичный свободному катиону $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ или комплексному соединению $\text{L2-}^{207}\text{Bi}$ [2].

Выводы

1. Подобраны методики химического модифицирования поверхности наночастиц диоксида церия и гексаферрита стронция, предварительно покрытого диоксидом кремния. Для наночастиц CeO_2 показано эффективное конъюгирование макроциклических азакраун-лигандов с использованием эпихлоргидрина и АРТЕS в качестве линкеров. Наночастицы SHF@SiO_2 были успешно покрыты линкером (3-аминопропил)триэтоксисиланом с дальнейшим привитием лигандов L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA. Конъюгацию подтвердили методами инфракрасной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, термогравиметрического анализа, совмещенного с масс-спектрометрией и определением изоэлектрической точки с помощью определения дзета-потенциала при различных pH.
2. Изучены условия образования меченых соединений конъюгатов наночастиц CeO_2 и SHF@SiO_2 и лигандов L1, L2 и *p*-SCN-Bn-DOTA с катионами $[^{65}\text{Zn}]\text{Zn}^{2+}$, $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ и $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$, а также проведено сравнение с сорбционной способностью нефункционализированных наночастиц. Для комплекса $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L1-}^{207}\text{Bi}$ при концентрации наночастиц 10^{-3} г/л и $c(\text{Bi}^{3+}) = 10^{-9}$ М РХЧ не превышает 63%. Данный результат не удовлетворяет требованиям для радиофармпрепаратов, так как полученное значение существенно ниже значения РХЧ для радиофармпрепаратов. В то же время степень мечения комплекса $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2-}^{207}\text{Bi}$ при концентрации $\text{CeO}_2\text{-ECH-NH-L2}$ 10^{-3} г/л и $c(\text{Bi}^{3+}) = 10^{-9}$ М составляет 93%. Оптимальные условия мечения радионуклидами ^{65}Zn , ^{44}Sc и ^{207}Bi конъюгатов наночастиц $\text{CeO}_2\text{-APTES-L1}$, $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2}$ и $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA}$ достигаются при концентрациях конъюгатов 0,1 г/л и катионов металлов 10^{-9} М. РХЧ 74% для $\text{CeO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{44}\text{Sc}$ и более 89% для всех остальных исследуемых комплексных соединений. Максимальное значение радиохимической чистоты было получено при $c(\text{Bi}^{3+}) = 10^{-9}$ М и концентрациях 10^{-3} г/л для конъюгатов SHF@SiO_2 , при этом степень связывания составляет 86%, 99% и 90% для комплексов $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L1-}^{207}\text{Bi}$, $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L2-}^{207}\text{Bi}$, $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-DOTA-}^{207}\text{Bi}$ соответственно. Полученные результаты приемлемы для потенциальных радиофармпрепаратов.
3. Показана устойчивость конъюгатов в биологически значимых средах. Наилучшие показатели достигнуты для комплексов конъюгатов $\text{CeO}_2\text{-APTES-L2-}^{44}\text{Sc}$ и $\text{SHF@SiO}_2\text{-APTES-L2-}^{207}\text{Bi}$. Количество связанного в комплекс катиона для данных соединений в сыворотке крови превышает 85% после 8 часов термостатирования при 37°C в среде для

комплекса со скандием и через сутки для конъюгата меченного висмутом. Данные результаты показывают перспективность проведения следующих этапов исследований в условиях *in vitro* и *in vivo*.

4. Цитотоксичность конъюгатов CeO₂-APTES-L2 и SHF@SiO₂-APTES-L2 при рабочих концентрациях (0,1 г/л и 10⁻³ г/л соответственно) на клетки EA.hy926 не выявлена через 24 часа инкубирования в среде. Выживаемость клеток составила 99%.
5. Установлено повышенное накопление в легких, селезенке и печени свободного катиона [⁴⁴Sc]Sc³⁺. Профиль биораспределения CeO₂-APTES-L2-⁴⁴Sc показывает накопление в сердце, селезенке и печени через 4 ч после инъекции, что характерно для наночастиц, но в сравнении со свободным катионом [⁴⁴Sc]Sc³⁺ не дает информации об устойчивости комплекса в *in vivo* условиях.
6. Соединение SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi устойчиво в условиях *in vivo* как минимум на начальном этапе эксперимента. Характер распределения SHF@SiO₂-APTES-L2-²⁰⁷Bi в органах лабораторной мыши свидетельствует об отличном от свободного [²⁰⁷Bi]Bi³⁺ поведении через 24 часа после инъекции и имеет профиль распределения специфичный для наночастиц.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus.

1. S. Khabirova, M. Menshikov-Tonyan, G. Aleshin, A. Prikhodko, D. Kozlov, E. Anokhin, K. Babeshkin, N. Titchenko, A. Zubenko, A. Shchukina, Yu. Fedorov, S. Kalmykov. Assessing the Biocompatibility and Stability of CeO₂ Nanoparticle Conjugates with Aza-crowns for Use as a Radiopharmaceutical // *RSC Medicinal Chemistry*. 2024. Vol. 15. P. 1–11 (WoS, JIF 4,1, Q1, 0,9 п.л./60%).
2. S. Khabirova, G. Aleshin, E. Anokhin, A. Shchukina, A. Zubenko, O. Fedorova, A. Averin, L. Trusov, and S. Kalmykov. Novel candidate theranostic radiopharmaceutical based on strontium hexaferrite nanoparticles conjugated with azacrown ligand // *Dalton Transactions*. 2023. Vol. 52, №6. P. 1731–1741. (WoS, JIF 3,5, Q1, 0,8 п.л./65%).
3. S. Khabirova, G. Aleshin, T. Plakhova, A. Zubenko, A. Shchukina, O. Fedorova, A. Averin, E. Belova, E. Bazarkina, K. Kvashnina, S. Kalmykov. CeO₂-azacrown conjugate as a nanoplatform for combined radiopharmaceuticals // *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, №24. P. 4484–4496. (WoS, JIF 4,4, Q1, 0,9 п.л./65%).
4. G. Aleshin, B. Egorova, A. Priselkova, L. Zamurueva, S. Khabirova, A. Zubenko, V. Karnoukhova, O. Fedorova, S. Kalmykov. Zinc and copper complexes with azacrown ethers and their comparative stability in vitro and in vivo // *Dalton Transactions*. 2020. Vol. 49, №19. P. 6249–6258. (WoS, JIF 3,5, Q1, 0,7 п.л./15%).

Прочие публикации:

5. Хабилова С.Ю. Функционализированные наночастицы CeO₂ для радиофармпрепаратов // *АПНХ-2020: материалы для генерации, преобразования и хранения энергии*. 2020. Москва, Россия. С. 212.
6. S. Khabirova, G. Aleshin, E. Anokhin, A. Shchukina, A. Zubenko. Radiolabelled strontium hexaferrite nanoparticles for radiopharmaceutical applications // *9th International Conference on Radiation in Various Fields of Research*. 2021. Херцег-Нови, Черногория. С. 144.
7. S. Khabirova, G. Aleshin, T. Plakhova, A. Shchukina, A. Zubenko. Nanoparticles of cerium (IV) oxide as a platform for potential radiopharmaceuticals // *The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021»*. 2021. Санкт-Петербург, Россия. С. 407.
8. S. Khabirova, G. Aleshin, E. Anokhin, A. Shchukina, A. Zubenko. Stability of ²⁰⁷Bi labeled strontium hexaferrite nanoparticles in biological relevant media // *5-я Российская конференция МедХим-Россия*. 2021. Волгоград, Россия. С. 131.
9. G. Aleshin, S. Khabirova, A. Shchukina, A. Zubenko, O. Fedorova, A. Averin, S. Kalmykov. Conjugates of Cerium Dioxide Nanoparticles with Macrocyclic Ligands for Radiopharmaceuticals: In Vitro And In Vivo Stability // *20th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals*. 2022. Верона, Италия. С. 1-2.
10. Хабилова С.Ю., Алешин Г.Ю., Анохин Е.О. Меченные ⁶⁵Zn магнитные наночастицы: получение и устойчивость в условиях in vivo // *X Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2022»*. 2022. Санкт-Петербург, Россия. С. 532.
11. Хабилова С.Ю., Алешин Г.Ю. Определение устойчивости меченного радионуклидом ⁶⁵Zn конъюгата наночастиц CeO₂ и азакраун-эфира // *X Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2022»*. 2022. Санкт-Петербург, Россия. С. 531.
12. S. Khabirova, G. Aleshin, E. Anokhin, A. Shchukina, A. Zubenko, O. Fedorova, S. Kalmykov. Modifying Strontium Hexaferrite Nanoparticles for Potential Theranostic Radiopharmaceuticals // *10th International Conference on Nuclear and Radiochemistry – NRC10*. 2024. Брайтон, Великобритания. С. 65–66.
13. S. Khabirova, M. Menshikov, G. Aleshin. Radiolabelled surface modified CeO₂ nanoparticles for eventual application in nuclear medicine // *XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии*. 2024. Сочи, Россия. С. 178.

Список литературы

1. Anokhin E.O., Trusov L.A., Kozlov D.A., Chumakov R.G., Sleptsova A.E., Uvarov O. V., Kozlov M.I., Petukhov D.I., Eliseev A.A., Kazin P.E. Silica coated hard-magnetic strontium hexaferrite nanoparticles // *Advanced Powder Technology*. Society of Powder Technology Japan, 2019. Vol. 30, № 9. P. 1976–1984.
2. Egorova B. V, Matazova E. V, Mitrofanov A.A., Yu A.G., Trigub A.L., Zubenko A.D., Fedorova O.A., Fedorov Yu V, Kalmykov S.N. Novel pyridine-containing azacrownethers for the chelation of therapeutic bismuth radioisotopes: Complexation study, radiolabeling, serum stability and biodistribution // *Nucl Med Biol*. Elsevier Inc., 2018. Vol. 60. P. 1–10.

3. Aleshin G.Y., Egorova B.V., Priselkova A.B., Zamurueva L.S., Khabirova S.Y., Zubenko A.D., Karnoukhova V.A., Fedorova O.A., Kalmykov S.N. Zinc and copper complexes with azacrown ethers and their comparative stability *in vitro* and *in vivo* // Dalton Transactions. 2020. Vol. 49, № 19. P. 6249–6258.
4. Schilling C., Hofmann A., Hess C., Ganduglia-Pirovano M.V. Raman Spectra of Polycrystalline CeO₂: A Density Functional Theory Study // Journal of Physical Chemistry C. American Chemical Society, 2017. Vol. 121, № 38. P. 20834–20849.
5. Fasolato C., Domenici F., Sennato S., Mura F., De Angelis L., Luongo F., Costantini F., Bordi F., Postorino P. Dimensional scale effects on surface enhanced Raman scattering efficiency of self-assembled silver nanoparticle clusters // Appl Phys Lett. 2014. Vol. 105, № 7. P. 1–5.
6. Lachine E.E., Noujaim A.A., Ediss C., Wiebe L.I. Toxicity, tissue distribution and excretion of ⁴⁶ScCl₃ and ⁴⁶Sc-EDTA in mice // International Journal of Applied Radiation and Isotopes. Pergamon Press. Printed in Northern Ireland, 1976. Vol. 27, № 7. P. 373–377.
7. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // Nat Biotechnol. 2015. Vol. 33, № 9. P. 941–951.
8. Zhang L., Li Z. Synthesis and characterization of SrFe₁₂O₁₉/CoFe₂O₄ nanocomposites with core-shell structure // J Alloys Compd. 2009. Vol. 469, № 1–2. P. 422–426.

Благодарности

Автор выражает благодарность и искреннюю признательность научному руководителю Г.Ю. Алешину за поддержку, ценные советы и вдохновение на всех этапах работы.

Автор благодарит Е.О. Анохина за синтез магнитных наночастиц и их характеризацию, Т.В. Плахову за помощь в проведении исследований и консультации. Автор выражает благодарность А.Д. Зубенко и А.А. Щукиной за синтез лигандов, Б.Н. Тарасевича за помощь в изучении структуры веществ методом ИК-спектроскопии, а также А.А. Аверина за проведение спектроскопии комбинационного рассеяния образцов, Dr. К.О. Квашниной и Dr. Л. Амидани за помощь в характеризации образцов методом HERFD XANES, А.Е. Баранчикову и К.А. Бабешкина за проведение термогравиметрического анализа, совмещенного с масс-спектрометрией, Е.С. Козлякову за исследование магнитных свойств наночастиц. Автор признателен А.С. Приходько за помощь проведение *in vitro* экспериментов и Л.С. Замуруевой за помощь в работе в условиях *in vivo*. Также автор признателен М.А. Меньшикову-Тонян за неоценимую помощь в проведении отдельных экспериментов.

Также автор благодарит научную группу лаборатории радиофармацевтической химии за ценные советы.

Автор выражает особую благодарность своей семье, друзьям и близким.