

BADANIE NANOCZĄSTEK MAGNETYTU W PEŁNEJ KRWI LUDZKIEJ ZA POMOCĄ ELEKTRONOWEGO REZONANSU PARAMAGNETYCZNEGO

A STUDY OF MAGNETITE NANOPARTICLES IN WHOLE HUMAN BLOOD BY MEANS OF ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE

Tomasz Kubiak^{1*}, Ryszard Krzyminiewski¹, Bernadeta Dobosz¹, Grzegorz Schroeder², Joanna Kurczewska², Magdalena Hałupka-Bryl^{1,3}

¹ Uniwersytet Adama Mickiewicza, Wydział Fizyki, Zakład Fizyki Medycznej, 61-614 Poznań, ul. Umultowska 85

² Uniwersytet Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Zakład Chemii Supramolekularnej, 61-614 Poznań, ul. Umultowska 89 b

³ Centrum Nanobiomedyczne UAM, 61-614 Poznań, ul. Umultowska 85

* e-mail: tomekfizyk@wp.pl

STRESZCZENIE

Pomiary pokrytych PEG (poli(glikol etylenowy)) nanocząstek magnetytu o średnicy rdzenia 10 nm wykonano metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego w zakresie temperatur 135–235 K. Badano nanocząstki znajdujące się w roztworze wodnym oraz w pełnej krwi ludzkiej. Przed dodaniem nanocząstek do krwi, zidentyfikowano naturalnie występujące w niej centra paramagnetyczne. Widmo EPR nanocząstek magnetytu miało postać szerokiej linii, której parametry silnie zależały od temperatury. W przypadku obu ośrodków zaobserwowano wzrost wartości współczynnika g wraz z obniżaniem temperatury środowiska. W przypadku nanocząstek w wodzie, schładzanie próbki do coraz niższych temperatur powodowało poszerzenie linii EPR, natomiast dla nanocząstek we krwi efekt ten był obserwowalny jedynie w przedziale temperatur od 190 do 235 K. Wartości parametrów linii EPR różniły się dla nanocząstek znajdujących się w dwóch ośrodkach (krwi i wodzie), co może wskazywać na wpływ środowiska na wzajemne interakcje nanocząstek.

Słowa kluczowe: nanocząstki magnetytu, EPR, ludzka krew pełna

ABSTRACT

The measurements of PEG-coated magnetite nanoparticles (PEG – polyethyleneglicol) with a core diameter of 10 nm, were done by means of Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy at the temperature range 135–235 K. Nanoparticles were examined in aqueous solution and in whole human blood. Paramagnetic centers naturally occurring in the blood were identified prior to the addition of nanoparticles. The EPR spectrum of magnetite nanoparticles has a form of a broad line, which parameters strongly depend on temperature. The increase in g -factor value was observed in case of both media, when the measurement temperature was being decreased. Gradual cooling of the sample of nanoparticles in water resulted in the broadening of the EPR line,

whereas for nanoparticles in the blood this effect was only observed in the temperature range 190 to 235 K. The values of EPR line parameters were different for nanoparticles in two mentioned media (water and blood), which may indicate the influence of the environment on the interactions between nanoparticles.

Keywords: magnetite nanoparticles, EPR, whole human blood

1. Wstęp

Nanocząstki magnetytu ze względu na niską toksyczność, biodegradowalność i superparamagnetyczny charakter mogą znaleźć wiele potencjalnych zastosowań w medycynie. Mogą służyć jako środki kontrastujące w obrazowaniu magnetycznym rezonansem jądrowym [1] oraz umożliwiać magnetyczną separację komórek nowotworowych [2]. Najbardziej obiecujące wydają się perspektywy zastosowania nanocząstek w leczeniu raka metodą hipertermii magnetycznej [3] czy wykorzystanie ich jako nośników leków w terapii celowanej [4]. Nanocząstki z rdzeniem magnetytowym mogą być bowiem koncentrowane w miejscu docelowym, np. w sąsiedztwie nowotworu, za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego. Nanocząstki pokrywane są otoczką polimerową, która zwiększa ich biokompatybilność, poprawia stabilność w roztworach, zapobiega aglomeracji oraz umożliwia dołączanie różnych ligandów [5]. Otoczenie nanocząstek powłoką z poli(glikolu etylenowego) PEG nie tylko przeciwdziała ich agregacji, ale przede wszystkim wydłuża czas krążenia we krwi. Nieosłonięte nanocząstki po wstrzyknięciu do krwiobiegu są bowiem pokrywane przez białka z osocza (opsoniny), a w ten sposób prezentowane są jako ciała obce i szybko eliminowane przez fagocyty (z układu fagocytów jednojądrzastych), występujące w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym [6].

W pełnej krwi ludzkiej istnieje naturalnie wiele centrów paramagnetycznych, do których należą przede wszystkim kompleksy molekularne, zawierające jony żelaza Fe^{3+} albo miedzi Cu^{2+} , a także wolne rodniki. Transferyna jest białkiem, które występuje w osoczu, przenosząc dwa atomy żelaza i dostarczając je do tkanek. Jej niewysycona forma, czyli apotransferyna, przyjmuje tylko jony Fe^{3+} , dlatego jony Fe^{2+} muszą przed związaniem zostać utlenione przy udziale obecnej w osoczu ceruloplazminy [7]. Ceruloplazmina, pełniąca rolę ferrokasydazy, zawiera paramagnetyczne jony miedzi, dlatego też może być badana metodą EPR [8]. We krwi w niewielkich ilościach pojawia się także zawierająca jony Fe^{3+} methemoglobina oraz rodniki pochodzące z reszt tryptofanu czy tyrozyny [9].

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego to technika, która umożliwia badanie substancji zawierających jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Sygnał EPR obserwujemy, gdy energia $h\nu$ kwantu promieniowania elektromagnetycznego padającego na próbkę odpowiada różnicy energii pomiędzy rozszczepionymi poziomami energetycznymi, co wyraża warunek rezonansu:

$$h\nu = g\mu_B B \quad (1)$$

We wzorze (1) B oznacza indukcję zewnętrznego pola magnetycznego, μ_B to magneton Bohra, natomiast g jest współczynnikiem rozszczepienia spektroskopowego, który pozwala na identyfikację centrum paramagnetycznego.

Celem niniejszej pracy było zbadanie metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego pokrytych biokompatybilnym polimerem nanocząstek magnetytu w roztworze wodnym oraz w pełnej krwi ludzkiej.

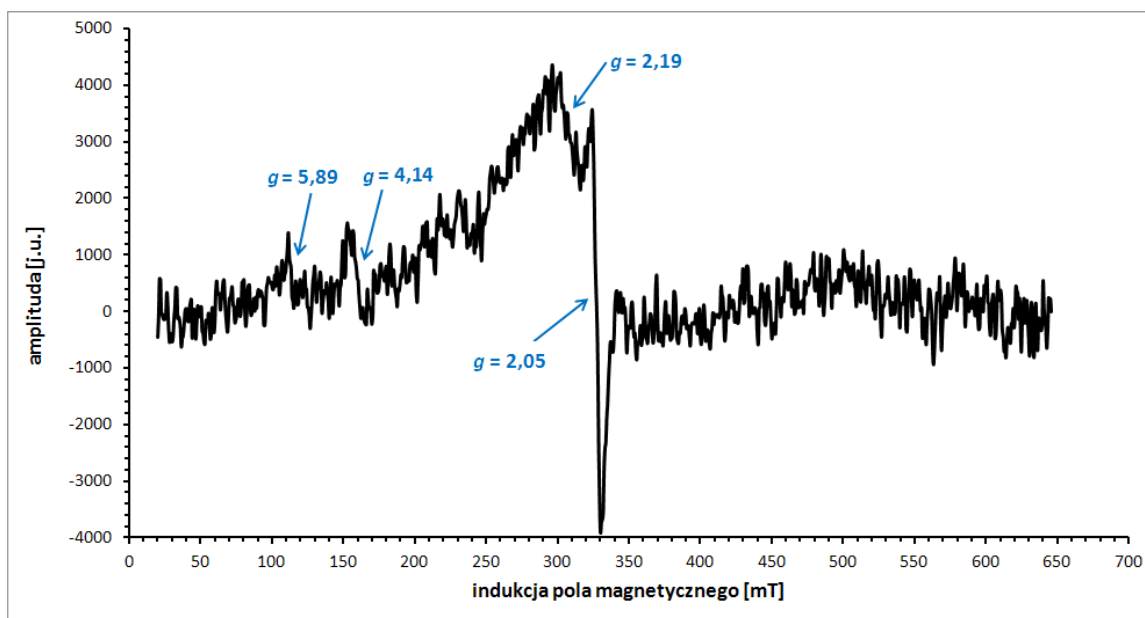
2. Materiały i metody

Materiał do eksperymentu stanowiły superparamagnetyczne nanocząstki z magnetytowym rdzeniem o średnicy 10 nm. Zostały one pokryte otoczką z poli(glikolu etylenowego) w celu uzyskania biokompatybilności. Badano nanocząstki w roztworze wodnym oraz dodane do pełnej krwi ludzkiej. Przygotowano dwie identyczne objętości (po 30 μ l) roztworu nanocząstek (7,2 mg/mL), z których jedną rozcieńczono 30 μ l dejonizowanej wody, a drugą zmieszano z 30 μ l krwi. Pomiary wykonano przy użyciu spektrometru Bruker EPR/ENDOR EMX-10, który pracuje w paśmie X (9,4 GHz).

Wykorzystano standardowy rezonator prostokątny ER 4102ST. Pomiary w zakresie 135–235 K umożliwił cyfrowy system kontroli temperatury ER 4131VT. Zastosowano drugą modulację pola magnetycznego o amplitudzie 1 mT i częstotliwości 100 kHz. Akwizycję widm pełnej krwi ludzkiej przeprowadzono w następujących zakresach przemiatania: 650 mT oraz 50 mT. W celu poprawy stosunku sygnału do szumu wykonywano 9 bądź 25 akumulacji, a podczas obróbki widm zarejestrowanych dla zakresu przemiatania 50 mT, zastosowano filtr dolnoprzepustowy, którego częstotliwość graniczną dobrano tak, aby nie zniekształcić sygnałów. Z kolei pomiary nanocząstek znajdujących się w roztworze wodnym oraz dodanych do krwi wykonano w zakresie przemiatania 650 mT.

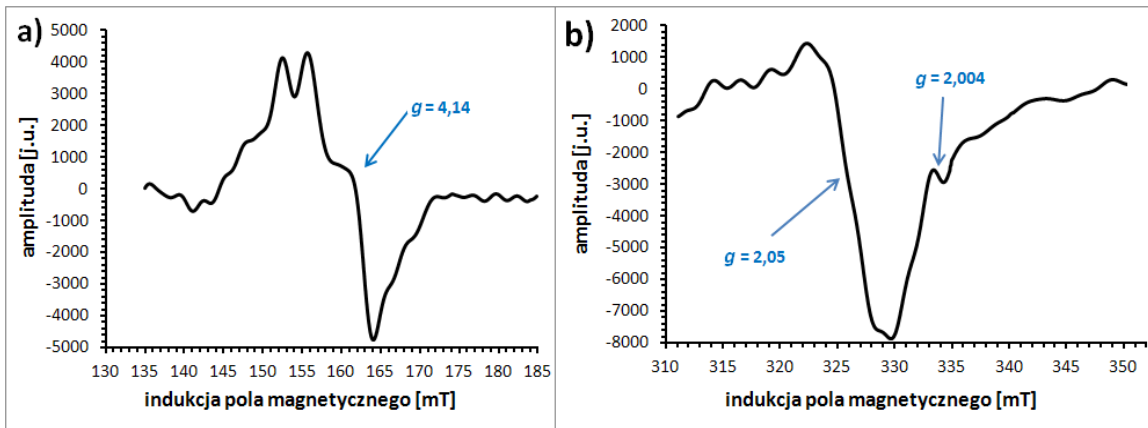
3. Wyniki i ich dyskusja

Widmo EPR pełnej krwi ludzkiej zarejestrowane w temperaturze 170 K w szerokim zakresie przemiatania 650 mT ujawniło występowanie sygnałów pochodzących od wysokospinowego Fe^{3+} w methemoglobinie ($g = 5,89$), wysokospinowego Fe^{3+} w transferynie ($g = 4,14$), niskospinowego kompleksu żelaza ($g = 2,19$) oraz jonów Cu^{2+} w ceruloplazminie ($g = 2,05$) (p. rys. 1). Identyfikacja sygnałów została przeprowadzona w oparciu o dane literaturowe dotyczące wartości g dla wymienionych centrów paramagnetycznych [10, 11].



Rys. 1. Widmo EPR pełnej krwi ludzkiej zarejestrowane w temperaturze 170 K. Widoczne sygnały od: wysokospinowego Fe^{3+} w methemoglobinie ($g = 5,89$), wysokospinowego Fe^{3+} w transferynie ($g = 4,14$), niskospinowego kompleksu żelaza ($g = 2,19$) oraz jonów Cu^{2+} w ceruloplazminie ($g = 2,05$)

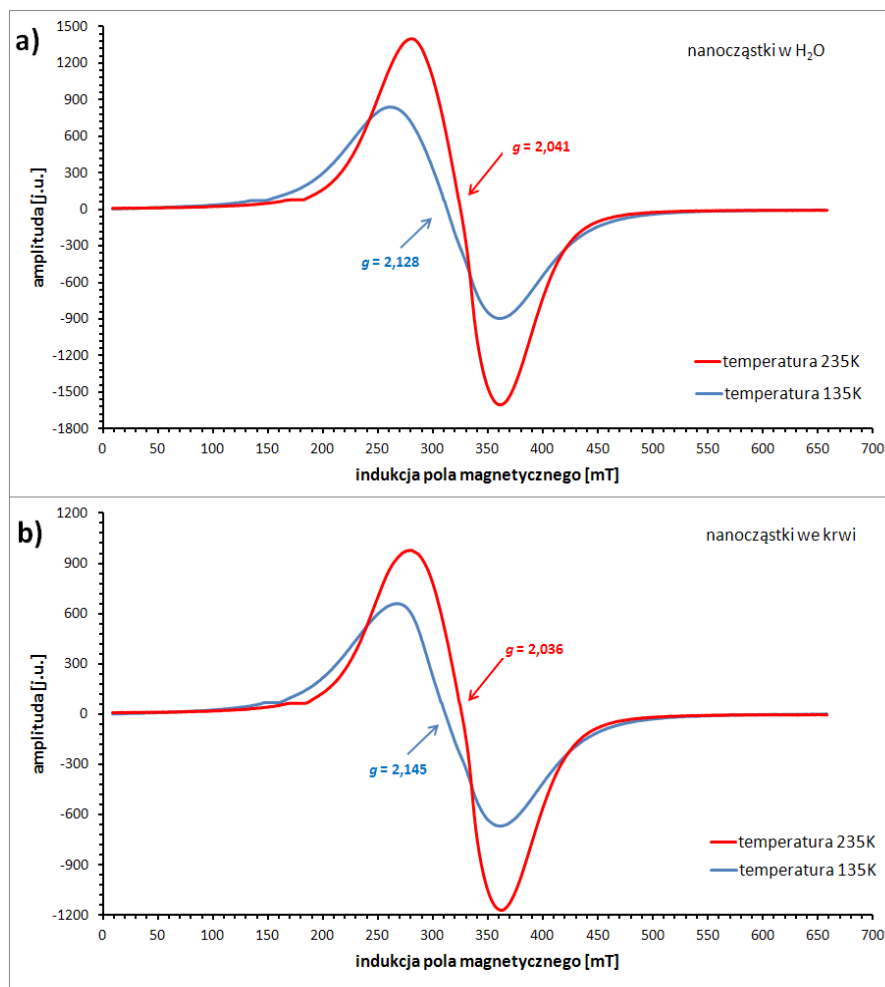
Sygnał pochodzący od jonów Fe^{3+} w transferynie składa się z trzech komponentów (p. rys. 2a). W transferynie dwa niehemowe jony Fe^{3+} występują w stanie wysokospinowym $S = 5/2$ i wykazują ośmiościenną koordynację. Każdy z nich wiąże cztery reszty aminokwasowe (dwie tyrozyny, jedną histydynę, kwas asparaginowy) oraz dwa atomy tlenu z synergistycznie związanych jonów węglanowych [12]. Rysunek 2b przedstawia natomiast linię EPR od jonów Cu^{2+} w ceruloplazminie. Charakterystyczny kształt sygnału i wyznaczona wartość współczynnika $g = 2,05$ wskazują, iż jest to komponent widma, który pochodzi od Cu typu II [13]. Warto przypomnieć, że jon Cu typu II wchodzi w skład trójatomowego klastra, wiąże się z dwoma histydynami a także z atomem tlenu lub cząsteczką wody [14]. Badania prowadzone wcześniej w Zakładzie Fizyki Medycznej UAM pozwoliły zidentyfikować w widmach EPR pełnej krwi ludzkiej sygnały od jonów Cu^{2+} w ceruloplazminie, Fe^{3+} w transferynie oraz linie od innych centrów paramagnetycznych [15, 16].



Rys. 2. Zarejestrowane w temperaturze 170 K. Sygnały EPR pochodzące od: a) jonów Fe^{3+} w transferynie ($g = 4,14$); b) jonów Cu^{2+} w ceruloplazminie ($g = 2,05$) oraz rodnika ($g = 2,004$) w pełnej krwi ludzkiej

Na rysunku 2b widać również sygnał, dla którego $g = 2,004$. Ma on prawdopodobnie pochodzenie rodnikowe. We krwi ludzkiej zaobserwowano już bowiem rodniki tyrozylowe, powstające w wyniku reakcji methemoglobiny z nadtlenkiem wodoru [9].

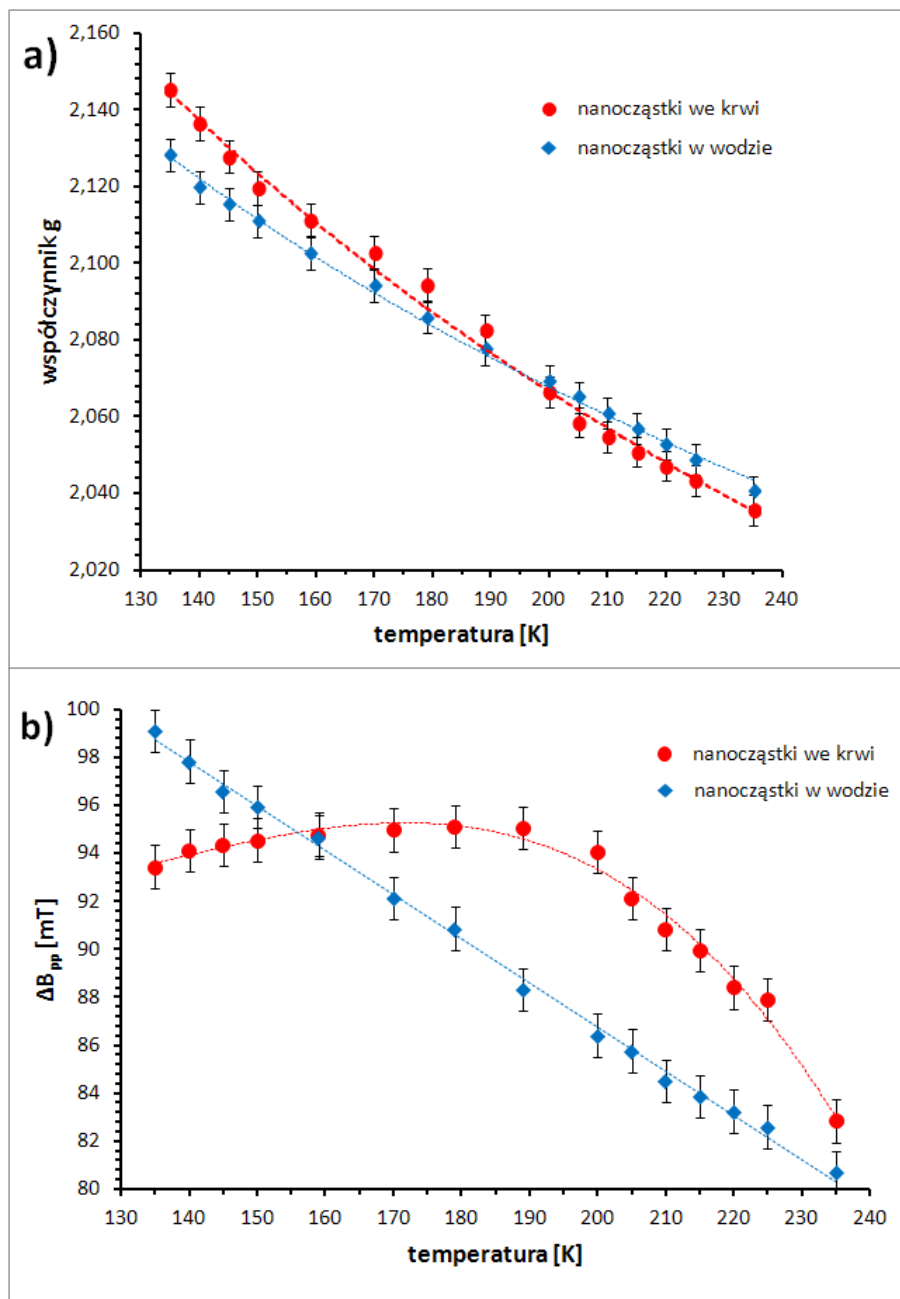
Widma EPR pokrytych poliglikolem nanocząstek magnetytu o średnicy rdzenia 10 nm stanowią szeroką linię. Porównanie sygnałów EPR zarejestrowanych w temperaturach 135 K i 235 K dla nanocząstek w wodzie oraz nanocząstek dodanych do pełnej krwi ludzkiej przedstawiono odpowiednio na rysunkach 3a i 3b.



Rys. 3. Porównanie sygnałów EPR zarejestrowanych w temperaturach 135 K i 235 K dla nanocząstek w: (a) roztworze wodnym oraz (b) pełnej krwi ludzkiej

Szeroka linia EPR jest charakterystyczna dla drobnoziarnistych osadów złożonych z małych krystalitów stanowiących pojedyncze domeny ferro- lub ferrimagnetyczne [17]. Nanocząstki Fe_3O_4 posiadają kubiczną strukturę spinelu odwróconego z jonami żelaza w dwóch stanach walencyjnych Fe^{2+} i Fe^{3+} w pozycjach tetraedrycznych oraz oktaedrycznych [18]. Na rysunku 3 widać wyraźnie, iż parametry widm EPR silnie zależą od temperatury. Ponadto wartości współczynnika g są różne w zależności od ośrodka. Zaobserwowane różnice mogą zatem wskazywać na wpływ środowiska na wzajemne interakcje nanocząstek. Z literatury wiadomo, iż wartość pola rezonansowego i szerokość linii EPR jest większa dla nanocząstek magnetytu pokrytych surfaktantem w porównaniu do ich nieopłaszczonych odpowiedników, gdyż te silniej oddziałują ze sobą magnetycznie [19].

Badania przeprowadzone w zakresie temperatur 135–235 K pokazały wzrost wartości współczynnika g wraz z obniżaniem temperatury pomiaru zarówno dla wodnych roztworów nanocząstek jak i wodnych roztworów nanocząstek zmieszanych z pełną krwią ludzką (p. rys. 4a).



Rys.4. Zależności temperaturowe wartości współczynnika g (a) oraz szerokości pik-pik (b) linii EPR od nanocząstek magnetytu w roztworze wodnym i pełnej krwi ludzkiej

Zaobserwowano ponadto, iż w zakresie temperatur 135–190 K wartości współczynnika g dla nanocząstek znajdujących się w pełnej krwi ludzkiej były większe niż wartości wyznaczone dla nanocząstek w roztworze wodnym. Natomiast w temperaturach powyżej 190 K współczynniki g dla nanocząstek w H_2O osiągały większe wartości niż współczynniki g dla nanocząstek we krwi. Stwierdzono również, iż linia EPR od magnetytowego rdzenia nanocząstek w roztworze wodnym poszerzała się wraz z obniżaniem temperatury. Inaczej sytuacja przedstawiała się w przypadku nanocząstek dodanych do pełnej krwi ludzkiej, gdzie szerokość linii wzrastała przy obniżaniu temperatury od 235 do 190 K, natomiast przy dalszym zmniejszaniu temperatury zaobserwowano plateau, a nawet niewielki spadek szerokości pik-pik (w granicy niepewności pomiaru) (p. rys. 4b).

Zmiany parametrów sygnałów EPR od temperatury dla nanocząstek w wodzie korespondują z wynikami wcześniejszych badań nad pokrytymi chitozanem nanocząstkami Fe_3O_4 znajdującymi się w toluenie [20]. Również pomiary w zakresie temperatur 120–240 K pokazały, iż sygnał EPR pochodzący od magnetytowego rdzenia o wymiarach 5 nm poszerza się wraz z obniżaniem temperatury i towarzyszy temu wzrost wartości współczynnika g [21]. Spadek wartości zewnętrznego, magnetycznego pola rezonansowego w miarę obniżania temperatury może być wyjaśniony poprzez wzrost wewnętrznych pól mikroskopowych, takich jak pole anizotropii wymiany [19]. Anizotropia wymiany występuje na styku warstw ferromagnetycznych i szkła spinowego, a spiny na powierzchni nanocząstek przyjmują właśnie rozmieszczenie charakterystyczne dla szkła spinowego, co udowodniono na przykładzie magnetycznych nanocząstek $\gamma-Fe_2O_3$ [22]. Silna anizotropia, której doświadczają spiny na powierzchni nanocząstki, także może mieć udział w przesunięciu pola rezonansowego oraz poszerzeniu widma EPR poprzez oddziaływania wymienne między spinami powierzchni i objętości rdzenia [23].

4. Podsumowanie

W eksperymencie prowadzonym metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego zbadano pokryte poli(glikolem etylenowym) nanocząstki magnetytu w roztworze wodnym i w pełnej krwi ludzkiej. Dla szerokich sygnałów EPR pochodzących od rdzeni nanocząstek wyznaczono szerokość linii oraz wartość współczynnika g . Pomiary w zakresie temperatur 135–235 K uwiaryściły silną zależność tych wielkości od temperatury, co zilustrowano na odpowiednich wykresach. Zaobserwowano, iż wartości parametrów linii EPR są różne dla nanocząstek znajdujących się w dwóch ośrodkach (krwi i wodzie). Technika EPR pozwoliła także zidentyfikować centra paramagnetyczne naturalnie występujące we krwi użytej w doświadczeniu.

LITERATURA

- [1] A. Antonelli, C. Sfara, E. Manuali, I.J. Bruce, M. Magnani: *Encapsulation of superparamagnetic nanoparticles into red blood cells as new carriers of MRI contrast agents*, Nanomedicine, vol. 6, 2011, s. 211–223.
- [2] H. Xu, Z.P. Aguilar, L. Yang, M. Kuang, H. Duan, Y. Xiong, H. Wei, A. Wang: *Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood*, Biomaterials, vol. 32, 2011, s. 9758–9765.
- [3] S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli, M. Mahmoudi: *Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, Advances in Colloid and Interface Science, vol. 166, 2011, s. 8–23.
- [4] Wahajuddin, S. Arora: *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers*, International Journal of Nanomedicine, vol. 7, 2012, s. 3445–3471.
- [5] T. Kubiak: *Wykorzystanie pokryć z poli(glikolu etylenowego) i chitozanu do zapewnienia biokompatybilności nanocząstkom w aplikacjach biomedycznych*, Polimery w Medycynie, vol. 44(2), 2014, s. 119–127.
- [6] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, P. Chen: *Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery*, Journal of Controlled Release, vol. 166, 2013, s. 182–194.
- [7] T. Kubiak: *Rola transferyny w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu indukowanemu wolnym żelazem w organizmie i jej potencjalne związki z rozwojem nowotworów*, Kosmos, vol. 62(4), 2013, s. 501–505.
- [8] J. Healy, K. Tipton: *Ceruloplasmin and what it might do*, Journal of Neural Transmission, vol. 114, 2007, s. 777–781.
- [9] D.A. Svistunenko, J. Dunne, M. Fryer, P. Nicholls, B.J. Reeder, M.T. Wilson, M.G. Bigotti, F. Cutruzzola, C.E. Cooper: *Comparative Study of Tyrosine Radicals in Hemoglobin and Myoglobins Treated with Hydrogen Peroxide*, Biophysical Journal, vol. 83, 2002, s. 2845–2855.
- [10] Y. Hirota, M. Haida, F. Mohtarami, K. Takeda, T. Iwamoto, S. Shioya, C. Tsuji, K. Hasumi, H. Nakazawa: *Implication*

- of ESR signals from ceruloplasmin (Cu^{2+}) and transferrin (Fe^{3+}) in pleural effusion of lung diseases, *Pathophysiology*, vol. 7, 2000, s. 41–45.
- [11] E.A. Preoteasa, G. Schianchi, D. Camillo Giori, O.G. Dului, A. Butturini, G. Izzì: *Unexpected Detection of Low- and High-Spin Ferrihemoglobin Derivatives in Blood Serum of Polytransfused Patients with Homozygous - Thalassemia under Chelation Therapy. An EPR Study*, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, vol. 8(2), 2013, s. 469–499.
- [12] T.E. Adams, A.B. Mason, Q.Y. He, P.J. Halbrooks, S.K. Briggs, V.C. Smith, R.T.A MacGillivray, S.J. Everse: *The Position of Arginine 124 Controls the Rate of Iron Release from the N- lobe of Human Serum Transferrin*, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278(8), 2003, s. 6027–6033.
- [13] F. Kouoh Elombo, M. Radosevich, M. Poulle, J. Descamps, S. Chtourou, T. Burnouf, J.P. Catteau, J.L. Bernier, N. Cotelle: *Purification of human ceruloplasmin as a by-product of CI-inhibitor*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 23, 2000, s. 1406–1409.
- [14] I. Bento, C. Peixoto, V.N. Zaitsev, P.F. Lindley: *Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation- binding sites*, *Acta Crystallographica D*, vol. 63(2), 2007, s. 240–248.
- [15] T. Kubiak, R. Krzymiński, B. Dobosz: *EPR Study of Paramagnetic Centers in Human Blood*, *Current Topics in Biophysics*, vol. 36(1), 2013, s. 7–13.
- [16] R. Krzymiński, Z. Kruczyński, B. Dobosz, A. Zając, A. Mackiewicz, E. Leporowska, S. Folwaczna: *EPR Study of Iron Ion Complexes in Human Blood*, *Applied Magnetic Resonance*, vol. 40, 2011, s. 321–330.
- [17] L.F. Gamarra, W.M. Pontuschka, E. Amaro Jr., A.J. Costa-Filho, G.E.S. Brito, E.D. Vieira, S.M. Carneiro, D.M. Escriba, A.M.F. Falleiros, V.L. Salvador: *Kinetics of elimination and distribution in blood and liver of biocompatible ferrofluids based on Fe_3O_4 nanoparticles: an EPR and XRF study*, *Materials Science and Engineering C*, vol. 28, 2008, s. 519–525.
- [18] O. Rahman, S.C. Mohapatra, S. Ahmad: *Fe_3O_4 inverse spinal super paramagnetic nanoparticles*, *Materials Chemistry and Physics*, vol. 132, 2012, s. 196–202.
- [19] Y. Köseoglu, F. Yildiz, D.K. Kim, M. Muhammed, B. Aktas: *EPR studies on Na-oleate coated Fe_3O_4 nanoparticles*, *Physica Status Solidi (c)*, vol. 1, 2004, s. 3511–3515.
- [20] B. Dobosz, R. Krzymiński, G. Schroeder, J. Kurczewska: *Electron paramagnetic resonance as an effective method for a characterization of functionalized iron oxide*, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* vol. 75, 2014, s. 594–598.
- [21] R. Krzymiński, T. Kubiak, B. Dobosz, G. Schroeder, J. Kurczewska: *EPR spectroscopy and imaging of TEMPO-labeled magnetite nanoparticles*, *Current Applied Physics*, vol. 14, 2014, s. 798–804.
- [22] R.H. Kodama, A.E. Berkowitz: *Atomic-scale magnetic modeling of oxide nanoparticles*, *Physical Review B*, vol. 59(9), 1999, s. 6321–6336.
- [23] N. Noginova, F. Chen, T. Weaver, E.P. Giannelis, A.B. Bourlinos, V.A. Atsarkin: *Magnetic resonance in nanoparticles: between ferro- and paramagnetism*, *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 19, 2007, s. 246208.

otrzymano / submitted: 23.03.2015
zaakceptowano / accepted: 30.03.2015