

УДК 539.211:544.723

МАГНИТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ С ФУНКЦИЯМИ НАНОРОБОТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЙ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

П.П. Горбик

*Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко Национальной академии наук Украины,
ул. Генерала Наумова, 17, Киев 03164, Украина,
e-mail: pgorbyk@mail.ru, gorbyk@isc.gov.ua*

Обобщены результаты исследований с целью обоснования концепции химического конструирования магниточувствительных наноконструкций с многоуровневой иерархической архитектурой и функциями медико-биологических нанороботов: распознавания микро-биологических объектов в биологических средах; целевой доставки лекарственных препаратов в клетки- и органы-мишени и депонирования; комплексной терапии химио-, иммуно-, нейтронзахватным, гипертермическим методами и диагностики в режиме реального времени; адсорбции остатков клеточного распада и их удаления из организма с помощью внешнего магнитного поля. Рассмотрены методы синтеза, физико-химические свойства, биологическая активность и практические применения наноконструкций.

Введение

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о перспективности использования магнитоуправляемых наноматериалов для решения ряда актуальных медицинских и биологических задач [1, 2]. На их основе созданы уникальные образцы наноконструкций с многоуровневой иерархической наноархитектурой, обладающие функциями медико-биологических нанороботов [3–12]: способностью распознавания микробиологических объектов в биологических средах, направленного транспорта и депонирования лекарственных препаратов в органах-мишенях, диагностики и терапии заболеваний на клеточном уровне, адсорбции и удаления продуктов клеточного распада под воздействием магнитного поля. Экспериментальные физико-химические данные, медико-биологические исследования *in vitro*, *in vivo* подтверждают их перспективность для создания новых форм комплексных лекарственных препаратов с цитотоксическим, иммунотерапевтическим и гипертермическим действием, иммуномагнитных сорбентов, средств для деконтаминации вирусов из плазмы и сыворотки донорской крови человека, нейтронзахватной терапии и др. Заметим, что проблема создания наномашин, нано- и молекулярных роботов для медико-биологических и биотехнологических применений сегодня разрабатывается в ведущих научных лабораториях мира, а соответствующее научно-прикладное направление является составляющей современного научно-технического прогресса, в том числе в медицине, биологии, биотехнологии [13–16].

В настоящей работе обобщены результаты исследований с целью обоснования концепции химического конструирования магниточувствительных наноконструкций с функциями медико-биологических нанороботов, рассмотрены методы синтеза, физико-химические свойства, биологическая активность и практические применения наноконструкций.

Схема химического конструирования нанокompозитов

Концепция наноструктур с функциями нанороботов реализуется [3–12] путем создания на поверхности магниточувствительного наноразмерного носителя эллипсоидальной формы (ядра) многоуровневой иерархической наноархитектуры, представляющей собой последовательность оболочек различного функционального назначения.

В качестве исходного материала ядра нанокompозита, представляющего первый уровень иерархической наноархитектуры при ее химическом конструировании, выбран монокристаллический магнетит размером 8–50 нм. Известно, что магнетит имеет биогенную природу и удовлетворительно выводится организмом. В схеме конструирования нанокompозитов он выполняет функции магниточувствительного носителя лекарственных препаратов; преобразователя энергии высокочастотного магнитного поля внешнего источника в тепловую при создании гипертермических зон; наночастицы с реакционно-способной поверхностью, что позволяет реализовать соответствующий химический нанодизайн второго уровня наноархитектуры полифункционального нанокompозита.

Второй иерархический уровень наноструктуры (1–4 нм) обеспечивает стабилизацию наноразмерного носителя модифицированием его поверхности биосовместимым покрытием (из полиакриламида (ПАА), γ -аминопропилсилоксана (АПС), димеркаптосукциновой кислоты (ДМСК), кремнезема, гидроксиапатита (ГА), оксидов титана или алюминия и т.п.). Наличие слоя модификатора сохраняет высокую удельную поверхность наночастицы магнетита и позволяет осуществить необходимую химическую функционализацию, например, гидроксильными, карбоксильными, тиольными, амино- и другими функциональными группами.

Биофункционализация нанокompозита осуществляется на третьем уровне (1–3 нм) иммобилизацией химио- (цисплатин (ЦП), доксорубин (ДР)), иммуно- (антитела, например, CD-95; иммуноглобулины (Ig)), радиотерапевтических (бор- и гадолинийсодержащие нейтронзахватные агенты) и диагностических (T_1 -, T_2 -контрастирующие агенты в МРТ диагностике, наночастицы благородных металлов) препаратов, а также биологических сенсоров, обеспечивающих распознавание специфических микробиологических объектов.

Следует отметить, что одни и те же элементы наноархитектуры могут выполнять различные функции. Так, наночастицы благородных металлов, благодаря наличию плазмонного резонанса, могут выполнять функции как физических сенсоров (оптические метки), так и терапевтических агентов (термальная и фотодинамическая терапия).

Функции четвертого иерархического уровня связаны, главным образом, с капсулированием нанокompозитов для сохранения их свойств и пролонгации действия лекарственных препаратов. Нанокapsулирование осуществляется декстраном, желатином, поливиниловым спиртом (ПВС), поливинилпирролидоном (ПВП).

Согласно приведенной схеме отработаны все основные технологические этапы синтеза полифункциональных нанокompозитов. Проведены также экспериментальные испытания их комплекса функций, которые, в принципе, совпадают с программами медико-биологических нанороботов и наномашин [1]. Разработаны (табл. 1) перспективные для практического применения нанотехнологии получения нанокompозитов, изучены их физические, химические и биологические свойства, а также магнитных жидкостей – коллоидных систем на основе синтезированных полифункциональных нанокompозитов, устойчивых в воде, фосфатном буфере и физиологическом растворе, в частности для доклинических исследований, о чем более подробно будет сказано ниже.

Таблица 1. Перечень синтезированных и исследованных экспериментальных образцов.

| Магнито-чувствительные полифункциональные наноконкомпозиты | Биофункционализованные магнито-чувствительные наноконкомпозиты | Биофункционализованные магнитные жидкости |
|--|---|--|
| Fe_3O_4 /ПАА Fe_3O_4 /γ-АПС Fe_3O_4 /ГА Fe_3O_4 /ГА-Ag Fe_3O_4 /SiO ₂ Fe_3O_4 /TiO ₂ Fe_3O_4 /Al ₂ O ₃ Fe_3O_4 /Al(OH) ₃ Fe_3O_4 /Gd ₂ O ₃ $Gd_xFe_{3-x}O_4$ | Fe_3O_4 /ПАА/Ig Fe_3O_4 /γ-АПС/Ig Fe_3O_4 /ГА/Ig Fe_3O_4 /ГА-Ag/Ig Fe_3O_4 /γ-АПС/CD-95 Fe_3O_4 /γ-АПС/ЦП/CD-95 Fe_3O_4 /ПАА/CD-95 Fe_3O_4 /ПАА /ЦП/CD-95 Fe_3O_4 /ГА/CD-95 Fe_3O_4 /ГА/ЦП/CD-95 Fe_3O_4 /ГА/ДР | Fe_3O_4 /ол. Na Fe_3O_4 /ол. Na/ЦП Fe_3O_4 /ол. Na/ПЕГ Fe_3O_4 /ол. Na/ПЕГ/ЦП Fe_3O_4 /ГА/ДР Fe_3O_4 /ДМСК Fe_3O_4 /Gd ₂ O ₃ /ол. Na Fe_3O_4 /Gd ₂ O ₃ /ол. Na/ПЕГ Fe_3O_4 /ДМСК/КБ Fe_3O_4 /ДМСК/SMCC/Ig Fe_3O_4 /ГА/ДР |

Обозначения: ол. Na – олеат Na; SMCC – спейсерная молекула сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (sulfo-SMCC); КБ – карборан.

Анализ условий направленного транспорта и удержания магнито-чувствительных носителей лекарственных препаратов с помощью магнитного поля

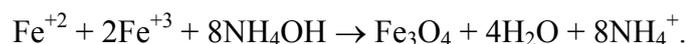
Проведены теоретические оценки условий транспорта и фиксации магнито-чувствительных наноконкомпозитов (носителей лекарственных препаратов) с помощью внешнего магнитного поля [17]. Показано, что при оптимальном выборе магнитных систем можно достичь удержания наноконкомпозитов (наноконтейнеров) с лекарствами даже в крупных магистральных кровеносных сосудах. Проведенные расчеты и найденные уровни градиентов свидетельствуют о реальных возможностях доставки и удержания магнитных носителей в органах-мишенях (табл. 2).

Таблица 2. Расчетные значения градиентов магнитного поля для удержания носителей.

| Уровни необходимых градиентов магнитного поля для некоторых кровеносных сосудов (диаметр $d \leq 3$ мм) | | |
|---|---------------------------------------|--------------------------|
| Тип сосудов | Скорость крови, U | Уровень градиента |
| вены | 0,1 см/с | $\nabla H \geq 7$ кЭ/см |
| артерии | 0,4 см/с | $\nabla H \geq 28$ кЭ/см |

Синтез магнито-чувствительного носителя

Синтез магнито-чувствительного наноразмерного носителя – нанодисперсного магнетита – осуществляли методом соосаждения [18–20] с использованием солей железа согласно реакции:



Методами рентгеноструктурного анализа (дифрактометр ДРОН-4-07) идентифицирована фаза Fe_3O_4 . С помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ) высокой разрешающей способности и атомной силовой микроскопии (АСМ) установлено, что частицы магнетита имеют эллипсоидную форму. Для изготовления наноконкомпозитов использовали фракцию частиц Fe_3O_4 размером 8 – 50 нм, которые

являются однодоменными. Удельная поверхность магнетита составляла $S = 90...180 \text{ м}^2/\text{г}$ (определено по термодесорбции азота на приборе KELVIN 1042 фирмы “COSTECH Instruments”).

Создание биосовместимых покрытий на поверхности наноразмерного магнетита

С целью стабилизации свойств магниточувствительных носителей и увеличения удельной поверхности проводили их модифицирование биосовместимыми покрытиями [6, 8–11].

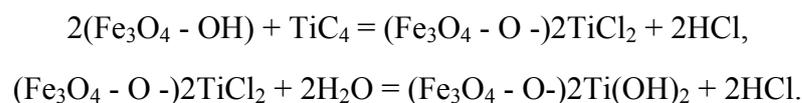
Нанотехнология модифицирования поверхности магнетита полиакриламидом заключается в формировании покрытия на поверхности наноразмерного магнетита полимеризацией акриламида (в качестве сшивающего агента использован N, N'-метилден-бис-акриламид) в плазме тлеющего высокочастотного разряда.

Модифицирование поверхности магнетита γ -аминопропилсилоксаном проводили жидкофазным способом в толуоле.

Модифицирование поверхности магнетита гидроксиапатитом осуществляли с целью предоставления магниточувствительным носителям Fe_3O_4 высокой биосовместимости. Установлено, что фаза гидроксиапатита на поверхности носителя характеризуется соотношением Ca / P = 1,67, что соответствует стехиометрии реакции его образования. Толщина слоя гидроксиапатита на поверхности наночастиц магнетита (оценено по соотношению площадей Fe2p- и Fe3p-линий при исследованиях методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и по приросту массы нанокompозита $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$) составляла $\sim 4 \text{ нм}$.

Модифицирование поверхности магнетита мезо-2,3-димеркаптосукциновой кислотой (ДМСК) повышало стабильность коллоидных систем в водной среде, улучшало биосовместимость материала, позволяло иммобилизацию необходимых соединений через тиольные и карбоксильные функциональные группы поверхности. Водный золь наночастиц магнетита, покрытых ДМСК, устойчив в широком диапазоне pH (3–11) в водных и фосфатных буферных системах. Установлено, что при $S_{\text{уд}} = 130 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$ концентрация групп SH составляла $0,019 \text{ ммоль}/\text{м}^2$.

Синтез нанокompозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ осуществляли методом жидкофазного молекулярного наслаивания. Идея метода состоит в последовательном наращивании монослоев заданного химического состава на поверхности твердого носителя. Реакции на поверхности Fe_3O_4 происходили по схеме:



Наличие на поверхности наночастиц Fe_3O_4 диоксида титана подтверждено результатами спектрометрического и рентгенографического исследования продуктов молекулярного наслаивания.

Установлено, что модифицирование поверхности частиц Fe_3O_4 слоем SiO_2 и TiO_2 способствует повышению термостабильности нанокompозитов (по отношению к свойствам магнетита).

С целью создания магнитоуправляемых нанокompозитов, поверхность которых покрыта монослоем гидроксида алюминия, разработана методика химического модифицирования поверхности наночастиц Fe_3O_4 изопропилатом алюминия жидкофазным методом в изопропиловом спирте. В результате синтеза образуется монослой гидроксида алюминия по схеме:



а поверхность приобретает амфотерный характер по счет групп Al–O(H). Установлено, что в результате синтеза на поверхности наноразмерных частиц магнетита образуется фаза гидроксида алюминия. После отжига образцов при 460 °С кристаллический магнетит частично превращается в $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$, образуется фаза Al_2O_3 .

Синтезированные наноконпозиты могут быть использованы при создания магнитоуправляемых лекарственных средств и адсорбентов.

Биофункционализация наноконпозитов

Биофункционализация является важным этапом в создании наноконпозитов с функциями медико-биологических нанороботов [6, 8–11], поскольку определяет функции распознавания микробиологических объектов в биологических средах и адресной доставки лекарственных препаратов (на уровне клеток- и органов-мишеней).

Иммобилизация малеимидактивированных иммуноглобулинов на поверхности наноконпозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДМСК}$ осуществлялась с целью получения иммуномагнитных наносорбентов и наноконпозитов с функциями распознавания. Разработана методика создания магнитной жидкости с одновременным модифицированием поверхности частиц магнетита ДМСК и иммобилизацией антител с помощью спейсерных молекул сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (Sulfo-SMCC).

Ковалентную иммобилизацию нормального иммуноглобулина человека (Ig) в случае наноконпозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ осуществляли после активации поверхности полиакриламида этилендиамином с целью образования реакционноспособных групп NH_2 . Окисление нормального Ig человека проводили в растворе NaIO_4 на ацетатном буфере. Ковалентное связывание окисленного Ig с поверхностью наноконпозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ (активированных этилендиамином) и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$ проводили в карбонатном буфере на физиологическом растворе.

Изучены неспецифическая (физическая) адсорбция и ковалентное присоединение моноклональных антител CD-95 на поверхности наноконпозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$ соответственно. В качестве сенсорных молекул использовали моноклональное мышинное антитело CD-95 против Fas-антигена человека изотипа Ig1, kappa, клоны DX2 производства DakoCytomation (Дания). Количество иммобилизованных антител определяли по калибровочному графику и по результатам рассчитывали значения адсорбции A , которые составляли 165 мкг/г для наноконпозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$; 137,7 мкг/г для $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$ и 590 мкг/г для $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ соответственно.

Отметим, что при распознавании специфического микробиологического объекта в биологической среде, например клетки, магниточувствительный носитель сенсора находится в непосредственной близости от нее или проникает через мембрану во внутриклеточное пространство. При этом есть возможность точного определения ее пространственного местонахождения и наблюдения за его изменением во времени, используя, например, магниторезонансные методы. Применяя компьютерную томографию, можно визуализировать этот процесс и получить объемные изображения. Последнее особенно важно для ранней диагностики заболеваний, установления точных размеров опухолей, проведения терапии и исследований в режиме реального времени.

Иммобилизация цисплатина и доксорубина на поверхности наноконпозитов

Исследована кинетика адсорбции цитостатических препаратов (цисплатина и доксорубина) на поверхности наноконпозитов. Указанные препараты используются практически во всех схемах современной онкотерапии. Показано, что количество адсорбированного цисплатина (по ионам Pt^{2+}) составляло 128 мг/г на поверхности наноконпозита $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$, 98,3 мг/г – $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$ и 60,1 мг/г на поверхности

нанокompозита $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$. Основная часть цитостатика адсорбировалась в течение 2–3 ч. Полученные данные указывают также на эффективную адсорбцию доксорубина на поверхности $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$. За первые 2 ч адсорбируется 60–70% вещества, а за сутки адсорбция происходит почти полностью (~93–97%). Это относится как к малым, так и к большим концентрациям доксорубина в исходных растворах [8–11].

Высвобождение препаратов с поверхности нанокompозитов

Кинетика десорбции Ig, иммобилизованного на поверхности нанокompозитов, изучалась с использованием в качестве модельной среды физиологического раствора [6, 8–11]. Показано, что высвобождение иммуноглобулина, иммобилизованного посредством ковалентной связи на поверхностях нанокompозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$, проходит медленнее и в меньшей степени, чем в случае неспецифической иммобилизации. Антитела, иммобилизованные на поверхности нанокompозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$, характеризуются слабой десорбцией Ig в модельной среде.

Исследованиями кинетики высвобождения цисплатина с поверхности нанокompозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ в физиологический раствор установлено, что за 80 мин высвобождается около 50% цитотоксического препарата.

Исследование цитотоксического эффекта нанокompозитов

Совместно с Институтом экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины изучено цитотоксическое влияние магниточувствительных нанокompозитов с адсорбированным цитостатиком, конъюгированных моноклональным антителом, на жизнеспособность клеточной линии карциномы молочной железы человека MCF-7. Исследованиями [6, 8–11] установлено, что использование магнитных нанокompозитов, в состав которых входит противоопухолевый препарат и моноклональное антитело CD-95, сопровождалось значительным синергическим эффектом цитотоксического действия. Их эффективность на 20–200%, в зависимости от состава нанокompозита, превосходила совместное действие соответствующих контрольных доз препаратов цисплатина и антитела. Выявлено, что эффективность нанокompозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}/\text{ЦП}/\text{CD-95}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{ЦП}/\text{CD-95}$, в состав которых входили противоопухолевый препарат ЦП и моноклональное антитело CD-95, в 1,5–2 раза превосходила общее цитотоксическое действие соответствующих контрольных доз.

Наличие синергического эффекта действия биологически активных компонентов нанокompозитов объясняется, во-первых, осуществлением адресной доставки магниточувствительных носителей комплекса "цитостатик–ориентированное моноклональное антитело" в опухолевые клетки благодаря распознаванию на их поверхности соответствующих рецепторов. При этом травматическое действие наноразмерного носителя на клеточную мембрану существенно улучшает проникновение лекарственного препарата через мембранный барьер. Во-вторых, оптимизированная система лиганд–рецептор играет важную роль в апоптозе злокачественных клеток. Связываясь со своим рецептором, антитело запускает иммунотерапевтический механизм, который также приводит к апоптозу.

Таким образом, использование магниточувствительных полифункциональных нанокompозитов, в состав которых входят противоопухолевый препарат и моноклональное антитело CD-95, позволяет реализовать распознавание специфических клеток и достичь цитотоксического эффекта при более низких концентрациях лекарственных средств, уменьшая при этом токсико-аллергическое влияние химиотерапевтического препарата на организм в целом.

Доклинические исследования влияния магнитных жидкостей на основе нанокompозитов

Образцы синтезированных магнитных жидкостей на основе нанокompозитов с иммобилизованным цисплатином и дополнительно модифицированных полиэтиленгликолем были исследованы в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины [6, 9, 11]. Изучен эффект их цитотоксического воздействия на асцитную карциному Эрлиха и солидную карциному Герена МЖ, содержащих следующие нанокompозиты:

1. Fe_3O_4 /олеат Na/ПЭГ, $C_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 3\text{ мг/мл}$,
2. Fe_3O_4 /олеат Na/ПЭГ/ЦП.

Исследование цитотоксического воздействия магнитных жидкостей на асцитную карциному Эрлиха. Исследования проведены на мышах-самцах гибридах (С57В1/6хDВА/21). Животным внутрибрюшинно прививали асцитную карциному Эрлиха по 2×10^6 клеток на животное. Доза Fe_3O_4 составляла 2 мг/кг массы животных, доза цисплатина – 2 мг/кг массы тела.

Противоопухолевую активность исследуемых МГ определяли по средним количествам прожитых животными дней по сравнению с контрольными мышами.

Процент торможения роста ($\gamma, \%$) асцитной опухоли Эрлиха оценивали по следующей формуле: $\gamma\% = (\alpha/\beta) \cdot 100$,

где α – разность количества прожитых дней в контрольной группе и количества прожитых дней в подопытной группе; β – количество прожитых дней в контрольной группе.

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, среднее количество прожитых дней у животных контрольной группы и у животных, которым вводили внутрибрюшинно магнитную жидкость Fe_3O_4 /ол.На/ПЭГ, достоверно не отличалась. В то же время, из приведенных данных видно, что у животных, получавших цисплатин и магнитную жидкость (Fe_3O_4 /ол.На/ПЭГ/ЦП), наблюдалось достоверное увеличение продолжительности жизни на 35% и 46% соответственно по сравнению с контрольной группой животных.

Таблица 3. Противоопухолевая активность магнитных жидкостей по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха *in vivo*.

| Группы животных | Продолжительность жизни, сутки |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| контроль (физ. раствор) | $17,0 \pm 1,4$ |
| ЦП | $23,0 \pm 1,0^*$ |
| Fe_3O_4 /ол.На/ПЭГ | $18,2 \pm 1,1$ |
| Fe_3O_4 /ол.На/ПЭГ/ЦП | $24,8 \pm 1,2^*$ |

* – достоверность $< 0,05$ в сравнении с контролем.

Таким образом, экспериментально доказана эффективность использования магнитной жидкости (Fe_3O_4 /ол.На/ПЭГ/ЦП) при лечении опухолей асцитной карциномы Эрлиха.

Исследование цитотоксического воздействия магнитных жидкостей на солидную карциному Герена. Исследования (табл. 4) проведены на лабораторных крысах-самцах линии Вистар массой 120 ± 5 г. Подопытным животным прививали подкожно на спину 25% суспензию опухолевой ткани карциномы Герена в физиологическом растворе (по 0,4 мл суспензии на животное).

Установлено, что цисплатин тормозил рост опухоли на 26,4% по массе. Показано, что у животных, которым вводили магнитную жидкость Fe₃O₄/ол.Na/ПЕГ/ЦП, масса опухоли уменьшалась на 40,2% по сравнению с контрольной группой. Наибольший процент торможения роста опухолей установлен у животных, которым вводили магнитную жидкость Fe₃O₄/ол.Na/ПЕГ/ЦП с наложенным постоянным магнитным полем. У этих животных масса опухолей уменьшалась на 57,9% по сравнению с контрольной группой.

Таблица 4. Противоопухолевая активность магнитных жидкостей, содержащих Fe₃O₄/ол.Na/ПЕГ/ЦП, по отношению к клеткам солидной карциномы Герена (*n*=10), в зависимости от воздействия магнитного поля (МП) *in vivo*.

| Группы животных | Масса опухоли, г |
|---|------------------|
| 1 - контроль (физ.раствор) | 31,8±2,4 |
| 2 - ЦП | 23,4±2,5 * |
| 3 - ЦП+МП | 19,6±2,9 * |
| 4 - Fe ₃ O ₄ /ол.Na/ПЕГ/ЦП | 19,2±2,1 * |
| 5 - Fe ₃ O ₄ /ол.Na/ПЕГ/ЦП + МП | 13,4±1,7 *,** |

* – достоверность < 0,05 в сравнении с контрольной группой; ** – достоверность < 0,05 в сравнении с 4-й группой.

Таким образом, экспериментально доказана эффективность использования магнитной жидкости Fe₃O₄/ол.Na/ПЕГ/ЦП при лечении опухолей карциномы Герена.

Разработка фундаментальных физико-химических основ новых векторных систем противоопухолевых препаратов

Целью исследований является разработка фундаментальных физико-химических основ новой векторной системы противоопухолевого препарата, оптимизация параметров, стандартизация, доклинические исследования, создание технического задания на ее промышленное производство. Достижение цели связано с разработкой научных основ магнитных жидкостей с цитотоксическими свойствами, моделей новой лекарственной формы для онкологии на основе стандартизированной субстанции векторной системы противоопухолевого препарата.

Необходимость и важность осуществления исследований объясняются актуальностью создания отечественных высокоэффективных лекарственных препаратов для применения в одной из самых проблемных отраслей медицины – онкологии, организации серийного промышленного выпуска конкурентоспособной продукции, принадлежащей к группе онкологических лекарственных средств, внедрения во врачебную практику новой методики лечения онкозаболеваний.

Разработаны и исследованы совместно с Институтом экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины образцы новой векторной системы противоопухолевого препарата, которая вызывает в 1,5–2 раза увеличение гибели опухолевых клеток, не создавая при этом дополнительных побочных токсико-аллергических воздействий на организм пациентов. Методика применения новой векторной системы противоопухолевого препарата может быть внедрена в клиническую практику при лечении злокачественных новообразований уже в ближайшее время.

Основу векторной системы составляет нанокompозит «цисплатин – магнитная жидкость», который содержит стабилизированные олеатом натрия наночастицы Fe₃O₄ размером 10–12 нм, конъюгированные с цисплатином. Оценки цитотоксического и противоопухолевого эффектов данного нанокompозита выполнены с учетом показателей

соотношения живых и погибших клеток в системе *in vitro*, а также по измерениям массы опухоли в системе *in vivo*. Для визуализации поступления нанокompозитов в клетки использован метод световой микроскопии (как наиболее распространенный и доступный в рутинной клинической лабораторной практике) благодаря специфической окраске наночастиц железа (метод Лилли).

К питательной среде, в которой культивировали клетки, нанокompозит «цисплатин-магнитная жидкость» добавляли в концентрации (по цисплатину), соответствующей IC50 (концентрация свободной формы препарата, приводящая к гибели 50% клеток). Через 48 ч инкубации цитотоксический эффект нанокompозита оценивали спектрофотометрически с использованием диметилтриэтилтетразолия бромид (МТТ-тест).

В условиях *in vivo* нанокompозит «цисплатин-магнитная жидкость» вводили животным внутривенно 4 раза через сутки в расчете (по цисплатину) 1,2 мг цисплатина / кг массы животного за одно введение.

Через 24 ч после последнего введения у животных оперативным путем удаляли опухоль, определяли ее массу и рассчитывали процент торможения роста путем сравнения с опухолями животных контрольной группы. После этого готовили гистологические препараты, окрашивающие по модифицированной методике Лилли для оценок методом световой микроскопии.

Для определения побочной нефро- и гепатотоксичности анализ сыворотки крови животных проводили на биохимическом анализаторе: определяли уровень мочевины, уровень креатинина, уровень общего билирубина, активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы.

Исследование противоопухолевой активности нанокompозита «цисплатин-магнитная жидкость» *in vitro* проводили на клетках рака молочной железы человека линии MCF-7 и клетках рака яичника человека линии A2780. Доза IC50 цисплатина для клеток MCF-7 составляла 2 мкг/мл, клеток линии A2780 – 2,5 мкг/мл.

Изучена противоопухолевая активность нанокompозитов «цисплатин-магнитная жидкость» *in vivo* на крысах с карциномой Герена. Результаты исследований противоопухолевой активности нанокompозитов «цисплатин-магнитная жидкость» *in vivo* по сравнению с цисплатином свидетельствовали об увеличении показателей торможения роста опухоли почти на 80%, при этом не наблюдалось усиления токсического воздействия платинасодержащего препарата. Методами оптической микроскопии подтверждено наличие в клетках карциномы Герена и на поверхности клеточных мембран агрегатов, образовавшихся из наночастиц, содержащихся в магнитной жидкости.

Таким образом, показано, что противоопухолевая активность векторных систем, содержащих цисплатин, позволяет достичь существенно большего цитотоксического эффекта платинасодержащего химиотерапевтического препарата (цисплатина) в системе *in vitro* и *in vivo* за счет его конъюгации с наночастицами магнитной жидкости, которая, по сравнению со свободной формой препарата, вызывает в 1,5–2 раза увеличение гибели опухолевых клеток, не создавая при этом дополнительных побочных токсико-аллергических реакций.

Нанокompозиты для нейтронзахватной терапии

Разработка научных подходов к решению проблемы внедрения магнитоуправляемых полифункциональных нанокompозитов в нейтронзахватную терапию (НЗТ), бесспорно, представляется целесообразной и актуальной задачей, поскольку они могут стать основой для создания новых типов малотоксичных селективных лекарственных средств с функциями направленной доставки к органам- или клеткам-мишеням, депонирования, гипертермии, комбинированной T_1 -, T_2 -МРТ-диагностики в режиме реального времени. В [21–23] разработаны методики синтеза и исследованы свойства новых типов нанокompозитов на основе однодоменного магнетита, в частности:

1. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}/\text{ДТПК}/\text{Gd}$ – ковалентной иммобилизацией на поверхности Fe_3O_4 диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПК) в комплексах с ионами Gd^{3+} ;

2. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{DMSA}/\text{Gd}$ – модифицированием поверхности магнетита мезо-2,3-димеркаптосукциновой кислотой (DMSA), к карбоксильным и сульфгидрильным функциональным группам которой ковалентно присоединены ионы Gd^{3+} ;

3. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{DMSA}/\text{карборан}$ – модифицированием поверхности магнетита DMSA и последующей функционализацией орто-тиокарбораном по реакции тиол-дисульфидного обмена;

4. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GdBO}_3$ – модифицированием поверхности магнетита боратами гадолиния GdBO_3 , образующимися в результате взаимодействия ионов Gd^{3+} с гидратированным анионом бора $[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4]^{2-}$ с последующим гидролизом в GdBO_3 . Наноконпозиты этого типа содержат одновременно бор и гадолиний и могут совмещать функции неорганического сцинтиллятора и нейтронзахватного агента.

Для синтеза наноконпозитов использованы компоненты, характеризующиеся удовлетворительной биосовместимостью. Строение и свойства наноконпозитов изучено комплексом физико-химических методов [21–23].

Наноконпозиты для деконтаминации вирусов

Совместно с Институтом гематологии и трансфузиологии АМН Украины установлена возможность вирусной инактивации гепатитов В и С из плазмы и сыворотки крови человека с применением магниточувствительных наноконпозитов, биофункционализированных специфическими иммуноглобулинами [24, 25].

Адсорбционные свойства наноконпозитов

Исследованы адсорбционные свойства магниточувствительных наноконпозитов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДМСК}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Al}_2\text{O}_3$ по отношению к ионам тяжелых металлов, биологически активным молекулам (ДНК, иммуноглобулинам), а также некоторым актуальным лекарственным препаратам (цисплатин, доксорубин) и комплексным соединениям (*цис*-дихлородиамминплатина). Исследованы изотермы и кинетика адсорбции. Экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности использования исследованных структур для создания нового поколения магниточувствительных адсорбентов, в частности медико-биологического, биотехнологического, технического и экологического назначения [6, 26–28].

Направления дальнейшей работы и практического внедрения результатов исследований

В дальнейшем необходимо осуществить работы с целью оптимизации полного технологического цикла изготовления медико-биологических наноконпозитов и магнитных жидкостей на их основе, закончить доклинические и выполнить клинические исследования. Необходимо также выяснение вопросов, связанных с токсикологическими аспектами, стандартизацией, возможностями производства и т.п.

С целью практического использования результатов исследований и внедрения разработок [29–31] в ИХП им. А.А. Чуйко НАН Украины разработан технологический регламент на производство вещества «Магнетит У» [32], которое является наноразмерным однодоменным Fe_3O_4 и может служить компонентом субстанции для лекарственных препаратов на основе исследованных наноструктур. Регламент передано для внедрения на Калушский опытно-экспериментальный завод ИХП НАН Украины. Совместно с Институтом экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины проводятся доклинические исследования новой магниточувствительной лекарственной формы онкологического препарата.

Заключение

Проблема создания нанороботов, в частности для медико-биологических применений, сегодня разрабатывается в ведущих научных лабораториях мира. Соответствующее научно-прикладное направление является составляющей современного научно-технического прогресса, в том числе в медицине, биологии, биотехнологии.

Концепция и методология химического конструирования магниточувствительных нанокompозитов с многоуровневой иерархической архитектурой и функциями нанороботов получила научное обоснование и экспериментальное подтверждение.

К настоящему времени выполнен комплекс экспериментальных и теоретических исследований с целью разработки научных основ создания новейших медико-биологических нанокompозитов, обладающих функциями нанороботов: способностью распознавания микробиологических объектов, направленного транспорта лекарственных препаратов, депонирования, диагностики и комплексной (химио-, иммуно-, нейтронзахватной, термо-) терапии заболеваний на тканевом и клеточном уровнях. Анализ литературных данных и экспериментальных результатов свидетельствует о перспективности использования указанных наносистем для создания новых диагностических, химио- и иммунотерапевтических, радиологических, гипертермических лекарственных препаратов, средств деконтаминации вирусов из плазмы и сыворотки донорской крови человека, магнитоуправляемых адсорбентов.

Отечественные исследования в указанном направлении находятся на передовых рубежах мировой науки. Это стало возможным благодаря творческому сотрудничеству в соответствующих междисциплинарных областях исследователей НАН Украины (Института химии поверхности им. А.А. Чуйко, Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого, Института металлофизики им. Г.В. Курдюмова), а также Института гематологии и трансфузиологии НАМН Украины.

Исследования выполнены при поддержке целевых комплексных научных программ НАН Украины «Фундаментальные проблемы создания новых наноматериалов и нанотехнологий» (2015-2019 г.г.) и «Фундаментальные проблемы создания новых веществ и материалов химического производства» (2012-2016 г.г.). Выполнение указанных научных программ, кроме научного, практического и методологического, предусматривает также учебный аспект [33]. Важной задачей является подготовка молодых специалистов, в частности высшей квалификации. Поэтому к работам, рассмотренным в этом обзоре, широко привлекалась творческая молодежь: аспиранты и студенты, которыми защищены три кандидатских [34–36] и ряд магистерских диссертаций.

По материалам исследований в прошедшие 5 лет изданы 3 монографии [6, 9, 11], в которых обобщены результаты, касающиеся современных проблем физико-химии наноматериалов, нанокompозитов и супрамолекулярных структур, актуальных для использования в технике, медицине, биологии, экологии и т.п. Они рассчитаны на специалистов отраслей нанохимии, нанофизики, материаловедения, химии и физики поверхности, занимающихся синтезом новых наноструктурных функциональных материалов и их практическим применением, преподавателей, аспирантов и студентов высших учебных заведений соответствующих специальностей. Вышли в свет учебные пособия [7, 10], которые, по сути, являются внедрением в образовательный процесс отечественной высшей школы (кафедра биоинформатики Национального технического университета Украины "КПИ", кафедра физики функциональных материалов Киевского национального университета им. Т.Шевченко) результатов новейших научных исследований, выполненных в Национальной академии наук Украины по нанотематике. Главной целью пособий является научное освещение и описание основных экспериментальных стадий создания биофункционализированных магниточувствительных наноматериалов и полифункциональных нанокompозитов, содействие формированию у

студентов практических навыков в области современных нанотехнологий. Учебные пособия получили гриф Министерства образования и науки, молодежи и спорта Украины и методического совета НТУУ «КПИ». Пособия построены на наиболее актуальных примерах синтеза, исследований и применений нанокompозитов в области медицины, биологии и биотехнологии. Приведенные научные данные, цикл лабораторных работ и методические указания могут быть использованы преподавателями и студентами высших учебных заведений при выполнении учебных программ по соответствующим специальностям.

В заключение автор выражает всем сотрудникам и коллегам, принимавшим участие в исследованиях, искреннюю благодарность и признательность за плодотворное сотрудничество.

Литература

1. Roco M.C., Williams R.S., Alivisatos P. Nanotechnology research directions. Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. – V. 156. – 171 p.
2. Levy L., Sahoo Y., Kim K.-S., Bergey J. E. Synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications. // Chem. Mater. – 2002. – V. 14. – P. 3715-3721.
3. Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных структур. За ред. А.П. Шпака, П.П. Горбика. – К.: Наукова думка, 2007. – Т. 1. – 428 с. С. 45-87.
4. Nanomaterials and Supramolecular Structures: Physics Chemistry, and Applications. Ed. Shpak A.P., Gorbyk P.P. – Springer, 2009. – 420 p.
5. Горбик П.П., Чехун В.Ф., Шпак А.П. Физико-химические и медико-биологические аспекты создания полифункциональных нанокompозитов и нанороботов / Наноструктурные материалы - получение, свойства, применение. – Минск, Беларуская навука, 2009. – С. 131-139.
6. Шпак А.П., Чехун В.Ф., Горбик П.П., Туров В.В. Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии, экологии. – К.: Наукова думка, 2011. – 444 с.
7. Горбик П.П., Горобец С.В., Турелик М.П. и др. Биофункционализация наноматериалов и нанокompозитов. – К.: Наукова думка, 2011. – 283 с.
8. Gorbyk P.P., Chekhun V.F. Nanocomposites of medicobiologic destination: reality and perspectives for oncology // Functional materials. – 2012. – V. 19, № 2. – P. 145 – 156.
9. Горбик П., Покутний С. Современные проблемы физики и химии поверхности: Магниточувствительные нанокompозиты с функциями нанороботов и атомоподобные наноструктуры. – Palmarium Academic Publishing, 2013. – 168 с.
10. Горбик П.П., Турелик М.П., Горобец С.В. та ін. Біофункціоналізовані наноматеріали і нанокompозити: наукові основи та напрями застосування. Навчальний посібник, електронне видання НМУ № Е 12/13-090, К.: НТТУ «КПІ», 2013. – 480 с.
11. Уварова І.В., Горбик П.П., Горобец С.В. та ін. Наноматеріали медичного призначення. За ред. В.В. Скорохода. К.: Наукова думка, 2014. – 415 с.
12. Горбик П.П. Нанокompозити з функціями медико-біологічних нанороботів: синтез, властивості, застосування // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології . – 2013. – Т. 11, №2. – С. 323-436.
13. Chao H. G. J., Xiao S.-J., Seeman N. C. A proximity-based programmable DNA nanoscale line // Nature. – 2010. – V. 465. – P. 202-205.
14. Lund K., Manzo A. J., Dabby N., N., et.al. Yan Molecular robots guided by prescriptive landscapes // Nature – 2010. – V. 465 – P. 206-210.

15. Muscat R.A., Bath J., Turberfield A.J. A programmable molecular robot // *Nano Lett.* – 2011. – V. 11(3). – P. 982-987.
16. Lewandowski B., De Bo G., Ward J. W., et.al. Sequence-Specific Peptide Synthesis by an Artificial Small-Molecule Machine // *Science.* –2013. – V. 339(6116). –P.189-193.
17. Гречко Л.Г., Горбик П.П., Лерман Л.Б., Чуйко О.О. Можливість використання магнітних наночасток як засобів транспорту і утримання лікарських препаратів в органи-мішені // *Доп. НАН України.* – 2006. – № 2. – С. 181 – 185.
18. Горбик П.П., Петрановська А.Л., Сторожук Л.П. та ін. Нанокompозити на основі магнетиту // *Український хімічний журнал.* – 2007. – Т. 73, № 5. – С. 24-29.
19. Горбик П.П., Петрановская А.Л., Турелик М.П. та ін. Проблема направленного транспорта лекарственных препаратов: состояние и перспективы // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – 2011. –Т. 2, № 4. – С. 433 – 441.
20. П.П. Горбик, Дубровин И.В., Петрановская А.Л. та ін. Магнитоуправляемый транспорт лекарственных препаратов: современное состояние разработки и перспективы // *Поверхность. Міжвід. зб. наук. пр.* –К.–2010. – Вип. (2) 17. С. 286–297.
21. Пилипчук Е.В., Петрановская А.Л., Горбик П.П. Синтез и свойства нанокompозитов на основе магнетита, модифицированного диэтилентриаминпентауксусной кислотой // *Наноструктурное материаловедение.* 2012. №3. С. 47-53.
22. Горбик П.П., Петрановская А.Л., Пилипчук Е.В., и др. Синтез магниточувствительных Gd-содержащих наноструктур // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – 2011. – Т. 2, № 4. – С. 385–392.
23. Турелик М.П., Горобець С.В., Македонська А.О., Горбик П.П. Біофункціоналізація нанокompозитів на основі магнетиту, модифікованого мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою // *Наукові вісті НТУУ КПІ, №1(18) с.* 149-154.
24. Вергун Л.Ю., Трохименко Є.П., Ісакова Л.М., Горбик П.П. Адсорбция оболочечных вирусов высокодисперсными оксидами // *ДНАН України.* – 2006. - №10. – С. 140-145.
25. Вергун Л.Ю. Климчук Д.А., Горбик П.П. и др. Синтез иммуномагнитных сорбентов для сепарации вирусов гепатитов В и С // *Мікробіологічний журнал.* – 2009 - № 71. – С. 65 – 71.
26. Туранская С.П., Каминский А.Н., Кусяк Н.В. и др. Синтез, свойства и применение магнитоуправляемых адсорбентов // *Поверхность. Сб. науч. тр. - К. - Вып. 4(19).*- 2012. - С.266-292.
27. Кусяк Н.В., Камінський О.М., Петрановська А.Л., Горбик П.П. Адсорбція катіонів на поверхні нанорозмірного магнетиту// *Поверхность. Сб. науч. тр. - К.: Наукова думка.*–2011. – Вып. 3(18).–С.151-155.
28. Камінський О.М., Кусяк Н.В., Петрановська А.Л. та ін. Адсорбція комплексів цис-дихлородіаміноплатини наноструктурами на основі магнетиту // *Металлофізика и новейшие технологии.* – 2013. – Т. 35, № 3. С. 389-406.
29. Пат. № 99211 Україна. Нанокапсула з функціями наноробота / Горбик П.П., Петрановська, А.Л., Турелик М.П. та ін. Опубл. 25.07.2012 р.
30. Пат. № 99211 Україна. Магнітна протипухлинна рідина / Патон Б.Є, Горбик П.П., Петрановська А.Л. Опубл. 7.07.2012 р.
31. Пат. № 99211 Україна. Магнітна рідина / Горбик П.П., Петрановська, А.Л., Турелик М.П. та ін. Опубл. 2.06.2012 р.
32. Свідоцтво № 46056 на ТТР (технологічний регламент) на виробництво речовини «Магнетит У» / Горбик П.П., Петрановська А.Л., Турелик М.П. та ін. Опубл. 7.09.2012 р.

33. Цільова комплексна програма фундаментальних досліджень «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології». К. 2010. – 191 с.
34. Сторожук Л. П. Синтез та властивості поліфункціональних магніточутливих нанокомпозитів: Автореф. дис. ... канд. хім. наук. Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. – К.: 2007. – 21 с.
35. Турелик М. П. Хімічне конструювання наноструктур з функціями медико-біологічних нанороботів. Автореф. дис. ... канд. хім. наук. Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. – К.: 2012. – 24 с.
36. Пилипчук Є. В. Синтез та властивості магніточутливих гадолініймісних нанокомпозитів. Автореф. дис. ... канд. хім. наук. Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. – К.: 2013. – 22 с.

МАГНІТОЧУТЛИВІ НАНОКОМПЗИТИ З ФУНКЦІЯМИ НАНОРОБОТІВ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ ТА БІОЛОГІЇ

П.П. Горбик

*Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ 03164, Україна, e-mail: pgorbyk@mail.ru, gorbyk@isc.gov.ua*

Узагальнено результати досліджень з метою обґрунтування концепції хімічного конструювання магніточутливих нанокомпозитів з багаторівневою ієрархічною архітектурою і функціями медико-біологічних нанороботів: розпізнавання мікро-біологічних об'єктів в біологічних середовищах; цільової доставки лікарських препаратів в клітини- та органи-мішені і депонування; комплексної терапії хіміо-, імуно-, нейтрон-захватним, гіпертермічним методами та діагностики в режимі реального часу; адсорбції залишків клітинного розкладу і їх видалення з організму за допомогою зовнішнього магнітного поля. Розглянуто методи синтезу, фізико-хімічні властивості, біологічна активність та практичні застосування нанокомпозитів.

MAGNETOSENSITIVE NANOCOMPOSITES WITH FUNCTIONS OF NANOROBOTS FOR APPLICATIONS IN MEDICINE AND BIOLOGY

P.P. Gorbyk

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str., 03164 Kyiv, Ukraine*

The results of studies were generalized with the aim of grounding the concept of chemical construction of magnetosensitive nanocomposites with multilevel hierarchic architecture and functions of medico-biological nanorobots: recognition of microbiological objects in biologic media; targeted delivery of medicinal preparations to cells and organs and deposition; complex therapy by chemo-, immuno-, neutron capture, hyperthermic methods and diagnostics in real-time regime; adsorption of residual cell debris and their removal from an organism with the help of external magnetic field. The methods of synthesis, physico-chemical properties, biologic activity and practical applications of nanocomposites were considered.