

## **НОВІТНІ МАГНІТОЧУТЛИВІ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНІ НАНОКОМПЗИТИ: МЕДИКО-ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ**

Узагальнено результати досліджень з метою наукового обґрунтування процесів хімічного конструювання магніточутливих поліфункціональних наноконструкцій з багаторівневою ієрархічною архітектурою та функціями розпізнавання мікробіологічних об'єктів у біологічних середовищах; цільової доставки лікарських препаратів до клітин- та органів-мішеней і депонування; комплексної терапії хіміо-, імуно-, радіо-, гіпертермічними методами та діагностики в режимі реального часу; адсорбції рештків клітинного розкладу та їх видалення з організму за допомогою зовнішнього магнітного поля. Наведено дані стосовно синтезу, властивостей та практичного використання наноконструкцій у галузях медицини, біології, екології.

**Ключові слова:** магніточутливі поліфункціональні наноконструкції, багаторівнева ієрархічна наноархітектура, цільова доставка лікарських препаратів, деконтамінація вірусів, магнітокеровані сорбенти.

Одним із напрямків науково-технічного і технологічного прогресу в галузях медицини, біології, екології є впровадження нанотехнологій. Так, дослідження, спрямовані на розробку новітніх магніточутливих поліфункціональних наноконструкцій з багаторівневою ієрархічною архітектурою та функціями розпізнавання мікробіологічних об'єктів у біологічних середовищах, цільової доставки лікарських препаратів до клітин- та органів-мішеней і депонування, комплексної терапії хіміо-, імуно-, радіо-, гіпертермічними методами, діагностики захворювань та спостереження за перебігом процесу лікування в режимі реального часу, адсорбції рештків клітинного розкладу та їх видалення з організму за допомогою зовнішнього магнітного поля; деконтамінації вірусних частинок з біологічних рідин; селективного вилучення речовин із багатокомпонентних середовищ методом магнітної сепарації тощо є актуальними та інтенсивно розвиваються в багатьох країнах світу [1–4].

Метою цієї роботи є експериментальне обґрунтування та практична перевірка шляхів реалізації вказаного напрямку, синтез новітніх поліфункціональних наноконструкцій, дослідження їх властивостей, встановлення можливостей практичного використання.

### **Схема хімічного конструювання поліфункціональних магніточутливих наноконструкцій**

На рис. 1 наведено схему хімічного конструювання поліфункціональних наноконструкцій [3–5], експериментально відпрацьованої за всіма основними етапами шляхом послідовного синтезу рівнів наноархітектури та всебічної перевірки їх функціональності.

Вибрано однодомений магнетит розміром 8–50 нм як перший рівень ієрархічної наноструктури – вихідного матеріалу для хімічного конструювання наноконструкцій. Відомо, що магнетит має біогенну природу і задовільно виводиться організмом. У цій схемі він може виконувати функції магніточутливого носія лікарських препаратів, перетворювача енергії високочастотного магнітного поля зовнішнього джерела в

теплову з метою створення гіпертермічних зон; наночастинки з реакційно-здатною поверхнею, що дозволяє реалізувати хімічний дизайн поліфункціонального нанокompозиту.



**Рисунок 1 – Схема хімічного конструювання наноархітектури багаторівневих поліфункціональних нанокompозитів**

Другий ієрархічний рівень (рис. 1) наноструктури (1–4 нм) забезпечує стабілізацію і біосумісність нанорозмірного носія шляхом модифікування його поверхні біосумісним покриттям (поліакриламід, кремнезем, гідроксоапатит, оксид титану чи алюмінію тощо). Наявність шару модифікатора зберігає високу питому поверхню наночастинки і дозволяє здійснити необхідну хімічну функціоналізацію, наприклад, гідроксильними, карбоксильними, тїольними, аміногрупами тощо.

Біофункціоналізація нанокompозиту здійснюється на третьому рівні (1–3 нм) шляхом іммобілізації хіміо- (платидіам, цисплатин), імуно- (антитіла), радіотерапевтичних (бор- та гадолінійвмісних нейтронзахватних агентів) і діагностичних ( $T_1$ -,  $T_2$ -контрастуючих агентів, наночастинок благородних металів) препаратів, а також сенсорів, що забезпечують розпізнавання специфічних мікробіологічних об'єктів (рис. 1).

Слід зазначити, що одні й ті ж елементи наноархітектури можуть також бути багатофункціональними. Наприклад, наночастинки благородних металів завдяки наявності плазмонного резонансу можуть виконувати функції як фізичних сенсорів (оптичні мітки), так і терапевтичних агентів (термальна та фотодинамічна терапія), а антитіла – функції імунотерапевтичних засобів та біологічних сенсорів.

Функції четвертого ієрархічного рівня пов'язані з капсулюванням нанокompatитів для збереження їх властивостей та пролонгації дії лікарських препаратів. Нанокompatування здійснюється декстраном, желатиною, полівініловим спиртом, полівінілпіролідом (рис. 1).

За наведеною схемою відпрацьовано основні технологічні етапи створення поліфункціональних нанокompatитів. Їх комплекс функцій [4, 5] співпадає з програмами медико-біологічних нанороботів і наномашин [1]. Розроблено (табл. 1) перспективні для практичного застосування нанотехнології синтезу, вивчено фізичні, хімічні і біологічні властивості магніточутливих нанокompatитів, магнітних рідин – колоїдних систем на основі синтезованих нанокompatитів, стійких у воді, фосфатному буфері та фізіологічному розчині, зокрема для доклінічних досліджень [6, 7].

**Таблиця 1 – Перелік синтезованих та досліджених експериментальних зразків**

Магніточутливі поліфункціональні нанокompatити	Біофункціоналізовані магніточутливі нанокompatити	Біофункціоналізовані магнітні рідини
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ПАА Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /γ-АПС Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА-Ag Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Al(OH) <sub>3</sub> Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Gd <sub>x</sub> Fe <sub>3-x</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ПАА/Ig Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /γ-АПС/Ig Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА/Ig Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА-Ag/Ig Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /γ-АПС/CD-95 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /γ-АПС/ЦП/CD-95 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ПАА/CD-95 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ПАА /ЦП/CD-95 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА/CD-95 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА/ЦП/CD-95 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА/ДР	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ол.Na Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ол.Na/ЦП Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ол.Na/ПЕГ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ол.Na/ПЕГ/ЦП Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА/ДР Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ДМСК Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /ол.Na Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /ол.Na/ПЕГ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ДМСК/КБ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ДМСК/SMCC/Ig Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ГА/ДР
ол. Na – олеат Na. SMCC- спейсерна молекула сульфосукцинімідил-4-(N-малейдометил)-циклогексан-1-карбоксилат (sulfo-SMCC). Решта скорочень – на рис. 1.		

Розглянемо результати досліджень властивостей і можливостей практичного використання нанокompatитів.

### **Аналіз умов транспорту й утримання магніточутливих носіїв лікарських препаратів за допомогою магнітного поля**

Проведено теоретичні оцінки умов транспорту й фіксації магніточутливих нанокompatитів (носіїв лікарських препаратів) за допомогою зовнішнього магнітного поля. Показано, що при оптимальному виборі магнітних систем можна досягти утримання нанокompatитів з ліками навіть у великих магістральних кровоносних судинах. Проведені розрахунки та знайдені рівні градієнтів показують реальну можливість доставки й утримання магнітних носіїв в органах-мішенях (табл. 2).

**Таблиця 2 – Розрахункові значення градієнтів магнітного поля для утримання носіїв**

Рівні необхідних градієнтів магнітного поля для деяких кровоносних судин (діаметр $d \leq 3$ мм)		
Тип судин	Швидкість крові, $U$	Рівень градієнта
Вени	0,1 см/с	$\nabla H \geq 7$ кЕ/см
Артерії	0,4 см/с	$\nabla H \geq 28$ кЕ/см

## **Створення біосумісного покриття на поверхні нанорозмірного магнетиту**

З метою стабілізації властивостей магніточутливих носіїв та збільшення питомої поверхні провадили їх модифікування біосумісними покриттями.

Нанотехнологія модифікування поверхні магнетиту поліакриламідом полягає у формуванні покриття на поверхні нанорозмірного магнетиту полімеризацією акриламіду зі зшиваючим агентом N,N'-метилен-біс-акриламідом у плазмі тліючого високочастотного розряду.

Модифікування поверхні магнетиту  $\gamma$ -амінопропілсілоксаном проводили рідиннофазним способом у толуолі.

Модифікування поверхні магнетиту гідроксоапатитом здійснювали з метою надання магніточутливим носіям  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  високої біосумісності. Встановлено: фаза гідроксоапатиту на поверхні носія характеризується співвідношенням  $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ , що відповідає стехіометрії реакції його утворення. Товщина шару гідроксоапатиту на поверхні наночастинок магнетиту, що оцінена за співвідношенням площ  $\text{Fe}2p$ - та  $\text{Fe}3p$ -ліній (досліджено методами рентгенівської фотоелектронної спектроскопії) та за природом маси нанокмпозиту  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ , становила  $\sim 4$  нм.

Модифікування поверхні магнетиту мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою вирішувало проблему стабільності колоїдної системи у водному середовищі, біосумісності матеріалу, іммобілізації необхідних сполук через тіольні і карбоксильні функціональні групи поверхні. Водний золь наночастинок магнетиту, покритих ДМСК, є стійким у широкому діапазоні рН (3–11) у водних і фосфатних буферних системах. Встановлено, що при  $S_{\text{пит}} = 130 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$ , концентрація SH-груп становила  $0,019 \text{ ммоль/м}^2$ .

## **Біофункціоналізація нанокмпозитів**

Біофункціоналізація наноматеріалів і нанокмпозитів є важливим етапом у створенні медико-біологічних нанороботів, оскільки надає їм функцій розпізнавання мікробіологічних об'єктів у біологічних середовищах, адресної доставки до них лікарських препаратів та імунотерапевтичних властивостей.

Іммобілізація малеїмід-активованих імуноглобулінів на поверхні  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДМСК}$  здійснювалась з метою отримання імуномагнітних наносорбентів та нанокмпозитів з функціями розпізнавання. Розроблено методику створення магнітної рідини з одночасним модифікуванням поверхні частинок магнетиту ДМСК і іммобілізацією антитіл за допомогою спейсерних молекул сульфосукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбоксилату (sulfo-SMCC).

Ковалентну іммобілізацію нормального імуноглобуліну людини (g) у випадку нанокмпозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$  здійснювали після активації поверхні поліакриламіду етилендіаміном з метою утворення реакційно-здатних  $-\text{NH}_2$  груп. Окиснення нормального Ig людини проводили в розчині  $\text{NaIO}_4$  на ацетатному буфері. Ковалентне зв'язування окисненого Ig з поверхнею нанокмпозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$  (активованих етилендіаміном) і  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$  проводили в карбонатному буфері на фізіологічному розчині.

Вивчено неспецифічну (фізичну) адсорбцію й ковалентне приєднання моноклональних антитіл CD-95 на поверхні нанокмпозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  і  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$  відповідно. Як сенсорні молекули використовували моноклональне мишаче антитіло CD-95 проти Fas-антигену людини ізотипу Ig1, kappa, клони DX2 виробництва DakoCytomation (Данія). Кількість іммобілізованих антитіл визначали за калібрувальним графіком і розраховували значення адсорбції A, що становило  $165 \text{ мкг/г}$  для нанокмпозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ ,  $137,7 \text{ мкг/г}$  для  $-\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$  і  $590 \text{ мкг/г}$  для  $-\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ .

Зазначимо, що при розпізнаванні специфічного мікробіологічного об'єкта в біологічному середовищі, наприклад клітини, магніточутливий носій сенсора перебуває в безпосередній близькості від неї або проникає через мембрану у

внутрішньоклітинний простір. При цьому є можливість визначення її просторового місцезнаходження й спостереження за його зміною в часі, використовуючи, приміром, магніторезонансні методи. Застосовуючи комп'ютерну томографію, можна візуалізувати цей процес і одержати об'ємні зображення. Останнє особливо важливо для ранньої діагностики захворювань, встановлення точних розмірів пухлин, проведення терапії і досліджень у режимі реального часу.

### **Імобілізація цисплатину та доксорубіцину на поверхні нанокompatитів**

Досліджено кінетику адсорбції цитостатичних препаратів (цисплатину та доксорубіцину) на поверхні нанокompatитів. Показано, що кількість адсорбованого цисплатину (за  $Pt^{2+}$ ) становила 128 мг/г на поверхні нанокompatиту  $Fe_3O_4/ПAA$ , 98,3 мг/г – на  $Fe_3O_4/\gamma$ -АПС та 60,1 мг/г на поверхні нанокompatиту  $Fe_3O_4/ГA$ . Основна частина цитостатика адсорбувалась протягом 2–3 годин. Одержані дані вказують на ефективну адсорбцію доксорубіцину на поверхні  $Fe_3O_4/ГA$ . За перші 2 години сорбується 60–70 % речовини, а за добу адсорбція проходить майже повністю (~ 93–97 %). Це відноситься як до малих, так і до великих концентрацій доксорубіцину.

### **Вивільнення препаратів з поверхні нанокompatитів**

Кінетика десорбції Ig, іммобілізованого на поверхні нанокompatитів, вивчалась з використанням фізіологічного розчину як модельного середовища. Показано, що вивільнення імуноглобуліну, іммобілізованого за допомогою ковалентного зв'язку на поверхнях нанокompatитів  $Fe_3O_4/ПAA$  і  $Fe_3O_4/\gamma$ -АПС, проходить повільніше і у меншій мірі, ніж у разі неспецифічної іммобілізації. Антитіла, іммобілізовані на поверхні нанокompatитів  $Fe_3O_4/ГA$  і  $Fe_3O_4/ГA/Ag$ , характеризуються слабкою десорбцією в модельному середовищі.

Дослідженнями кінетики вивільнення цисплатину з поверхні нанокompatитів  $Fe_3O_4/ПAA$  в фізіологічний розчин встановлено, що за 80 хв вивільнюється близько 50 % цитотоксичного препарату.

### **Дослідження цитотоксичного ефекту нанокompatитів**

Спільно з Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України вивчено цитотоксичний вплив магніточутливих нанокompatитів з адсорбованим цитостатиком, кон'югованим моноклональним антитілом, на життєздатність клітинної лінії карциноми молочної залози людини MCF-7. Дослідженнями встановлено, що використання магнітних нанокompatитів, до складу яких входить протипухлинний препарат і моноклональне антитіло CD-95, супроводжувалося значним синергічним ефектом цитотоксичної дії. Їх ефективність на 20–200 % перевершувала сумісну дію відповідних контрольних доз препаратів цисплатину і антитіла. Так, виявлено, що ефективність нанокompatитів  $Fe_3O_4/ПAA/ЦП/CD-95$  і  $Fe_3O_4/ГA/ЦП/CD-95$ , до складу яких входили протипухлинний препарат ЦП і моноклональне антитіло CD-95, в 1,5–2 рази перевершувала спільну цитотоксичну дію відповідних контрольних доз.

Наявність синергічного ефекту дії біологічно активних компонентів нанокompatитів пояснюється, по-перше, здійсненням адресної доставки магніточутливим носієм комплексу «цитостатик – орієнтоване моноклональне антитіло» до пухлинних клітин завдяки розпізнаванню на їх поверхні відповідних рецепторів. При цьому травматична дія нанорозмірного носія на клітинну мембрану істотно покращує проникнення лікарського препарату через мембранний бар'єр. По-друге, оптимізована система ліганд–рецептор відіграє важливу роль у апоптозі злоякісних клітин. Зв'язуючись зі своїм рецептором, антитіло запускає імунотерапевтичний механізм, який призводить до апоптозу.

Отже, використання магніточутливих поліфункціональних нанокompatивів, до складу яких входять протипухлинний препарат і моноклональне антитіло CD-95, дозволяє реалізувати розпізнавання специфічних клітин і досягти цитотоксичного ефекту при більш низьких концентраціях лікарських засобів, зменшуючи при цьому токсико-алергічний вплив хіміотерапевтичного препарату на організм в цілому.

### **Доклінічні дослідження впливу магнітних рідин на основі нанокompatивів**

З метою оцінки перспективності розроблених наносистем для практичного використання спільно з Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України розпочато доклінічні дослідження.

Зокрема, дослідженнями *in vivo* на мишах-самцях, гібридах лінії C57Bl/6DBA/21, котрим внутрішньочеревно перещеплювали асцитну карциному Ерліха по  $6 \cdot 10^6$  клітин на тварину, встановлено, що застосування в складі магнітної рідини нанокompatивів  $Fe_3O_4/ol.Na/ПЕГ/ЦП$  суттєво (на 22 %) підвищує терапевтичний ефект цитостатичного препарату.

### **Нанокompatиви для деконтамінації вірусів**

Спільно з Інститутом гематології і трансфузіології АМН України встановлено можливість вірусної інактивації гепатитів В та С із плазми і сироватки крові людини із застосуванням магніточутливих нанокompatивів, біофункціоналізованих специфічними імуноглобулінами.

### **Адсорбційні властивості нанокompatивів**

Досліджено адсорбційні властивості магніточутливих нанокompatивів  $Fe_3O_4/DMCK$ ,  $Fe_3O_4/\gamma\text{-APC}$ ,  $Fe_3O_4/ПAA$ ,  $Fe_3O_4/ГA$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2$ ,  $Fe_3O_4/TiO_2$ ,  $Fe_3O_4/Al_2O_3$  тощо стосовно іонів важких металів, біологічно-активних молекул (ДНК, імуноглобулінів, лікарських препаратів), актуальних комплексних сполук. Досліджено ізотерми та кінетику адсорбції. Експериментальні дані свідчать про перспективність використання досліджених структур для створення магніточутливих адсорбентів, зокрема медико-біологічного, біотехнологічного та екологічного призначення.

На завершення автори висловлюють щире подяку всім співробітникам і колегам за творчу співпрацю.

### **Бібліографічний список**

1. Roco M.C. Nanotechnology research directions. Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade / M.C. Roco, R.S. Williams, P. Alivisatos. – 2002. – V. 156. – Dordrecht : Kluwer Academic Publishers. – 171 p.
2. Физико–химия наноматериалов и супрамолекулярных структур : Т. 1 / Под ред. А.П. Шпака, П.П. Горбика. – К. : Наукова думка. – 2007. – С. 45–87.
3. Nanomaterials and Supramolecular Structures. Physics Chemistry, and Applications. A.P. Shpak, P.P. Gorbyk (eds.) – Springer. – 2009. – P. 63–78.
4. Горбик П.П. Физико-химические и медико-биологические аспекты создания полифункциональных нанокompatивов и нанороботов. Наноструктурные материалы – получение, свойства, применение / П.П. Горбик, В.Ф. Чехун, А.П. Шпак. – Минск, Белорусская наука, 2009. – С. 131–139.
5. Нанокapsула з функціями наноробота. Патент на винахід № 86322. Україна. 10.04.2009 / П.П. Горбик, А.Л. Петрановська, Д.Г. Усов, Л.П. Сторожук
6. Наноматериалы и нанокompatивы в медицине, биологии, экологии / под ред. А.П. Шпака, В.Ф. Чехуна ; сост. : П.П. Горбик, В.В. Туров. – К. : Наукова думка, 2011. – 444 с.
7. Біофункціоналізація наноматеріалів і нанокompatивів : навч. посібник / П.П. Горбик, С.В. Горобець, М.П. Турелик, В.Ф. Чехун, А.П. Шпак. – К. : Наукова думка, 2011. – 283 с.