

С.П. Туранська<sup>1</sup>, А.П. Кусяк<sup>1</sup>, А.Л. Петрановська<sup>1</sup>,  
С.В. Горобець<sup>2</sup>, В.В. Туров<sup>1</sup>, П.П. Горбик<sup>1</sup>

## ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ МАГНІТОКЕРОВАНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ НА ОСНОВІ ДОКСОРУБІЦИНУ НА ПРИКЛАДІ КЛІТИН *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

<sup>1</sup>Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, E-mail: sturanska@ukr.net

<sup>2</sup>Національний технічний університет України (КПІ)  
проспект Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

Синтезовано нові магніточутливі наноконкомпозити, що містять сучасний протипухлинний препарат доксорубіцин. Досліджено їх біосумісність та біоактивність. Зокрема, встановлено, що в кількостях 0,6-0,8 мг доксорубіцину/зразок наноконкомпозити виявляють цитотоксичну і антипроліферативну дію по відношенню до модельних клітин *Saccharomyces cerevisiae*. Показана перспективність використання цих наноконкомпозитів в онкології.

**Ключові слова:** нанорозмірний однодомений магнетит, наноконкомпозити  $Fe_3O_4$ /доксорубіцин,  $Fe_3O_4/SiO_2$ /доксорубіцин,  $Fe_3O_4/TiO_2$ /доксорубіцин,  $Fe_3O_4$ /гідроксиапатит/доксорубіцин, доксорубіцин, дріжджові клітини, цитотоксичність, проліферація.

### ВСТУП

Доксорубіцин – протипухлинний антибіотик антрациклінового ряду, цитостатичний препарат, який в наш час застосовується майже в усіх схемах хіміотерапії онкологічних захворювань. Дослідження властивостей доксорубіцину в складі магніточутливих поліфункціональних наноконкомпозитів є актуальними з наукової та прикладної точок зору, оскільки відносяться до галузі розробок новітніх медичних засобів керованої доставки, зокрема, для онкології [1-15]. На багатьох стадіях вказаних досліджень важливим завданням залишається вибір ефективної та надійної методології контролю цитотоксичної активності наноконкомпозитів та моделей нових форм лікарських засобів на їх основі. Такий контроль навіть на доклінічному етапі досліджень сьогодні є досить вартісним процесом, потребує наявності модельних онкологічних клітинних ліній, спеціального обладнання тощо.

В роботах [16-18] досліджено взаємодію доксорубіцину з клітинами хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, зокрема, наявність цитотоксичного впливу антибіотика на клітини [16, 17] та зниження швидкості їх проліферації [18]. Вказані ефекти є характерними для доксорубіцину та обумовлені, зокрема, його участю в редокс-циклічних реакціях та відповідним збільшенням кількості вільнорадикальних молекул, індукуванням оксидативного стресу, затримками клітинного циклу в G<sub>1</sub>- та S-фазах. Однак, нам не вдалося відшукати в наукових джерелах даних стосовно впливу магніточутливих наноконкомпозитів, що містили доксорубіцин, на клітини хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Основною метою цієї роботи було дослідження цитотоксичного впливу нових магнітокерованих поліфункціональних наноконкомпозитів на основі однодоменого магнетиту ( $Fe_3O_4$ ) та доксорубіцину на клітини *Saccharomyces cerevisiae*. Постановка мети досліджень є новою та актуальною, оскільки забезпечує експериментальне відпрацювання на вибраних об'єктах ефективної, надійної, безпечної та відносно недорогої методики доклінічного контролю цитотоксичної активності наноконкомпозитів, що містять доксорубіцин, та моделей нових форм лікарських засобів на їх основі.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для досліджень синтезували нанокompозити  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{доксорубіцин(ДР)}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ДР}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{ДР}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{гідроксиапатит(ГА)}/\text{ДР}$ .

*Синтез нанорозмірного однодомного магнетиту та модифікування його гідроксиапатитом.*

Нанодисперсний однодомний магнетит синтезували за реакцією Елмора. Для досліджень використовували фракцію частинок розміром 6-23 нм, які є однодомними. Питома поверхня дослідних зразків становила  $S = 105\text{-}180 \text{ м}^2/\text{г}$ . Модифікування поверхні нанорозмірного магнетиту гідроксиапатитом (одержання композитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ ) здійснювали за реакцією:  $10 \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 + 6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + 8\text{NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Згідно даним рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (РФС) величина співвідношення Ca/P в іммобілізованому поверхневому шарі синтезованих зразків відповідає стехіометрії гідроксиапатиту (Ca/P = 1,67). Більш детально методику синтезу однодомного  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , нанокompозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ , адсорбційної іммобілізації доксорубіцину на поверхні наноструктур, отримання нанокompозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{доксорубіцин}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{ДР}$  та їх властивості наведено в [19].

*Модифікування магнетиту тетраетоксисиланом. Одержання нанокompозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .*

Для одержання нанокompозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , як модифікуючий агент, обрано тетраетоксисилан (ТЕОС) [20]. Методика синтезу нанокompозитів на основі магнетиту, модифікованого діоксидом кремнію, ґрунтується на використанні процесів гідролізу ТЕОС. Вміст покриття складав 0,2 г  $\text{SiO}_2$  на 1 г магнетиту.

Тetraетоксисилан широко використовується для модифікування поверхні органічних і неорганічних матеріалів, наприклад, при іммобілізації білків та в афінній хроматографії. Модифікування магнетиту ТЕОС може дозволити не лише функціоналізувати поверхню, але й створити нанокompозити з високою адсорбційною здатністю.

В основі перетворень ТЕОС на поверхні магнетиту покладено реакцію гідролізу ТЕОС та наступної конденсації продуктів гідролізу [21, 22]. Структура кінцевих продуктів полімеризації в значній мірі залежить від умов проведення синтезу: температури, рН середовища, умов перемішування, наявності каталізаторів тощо.

Приєднання модифікатора відбувається в результаті утворення водневих зв'язків між силанольною групою і гідроксильною групою поверхні магнетиту з подальшою молекулярною конденсацією з утворенням силоксанового покриття Si-O-Si за механізмом полімолекулярної конденсації.

За результатами модифікування питома поверхня нанокompозиту збільшується від  $105 \text{ м}^2/\text{г}$  (для немодифікованого магнетиту) до  $130 \text{ м}^2/\text{г}$ .

Модифікування поверхні магнетиту виконували методом адсорбційного модифікування поверхні за методикою [23]. Готували 20%-й розчин ТЕОС: 7,5 мл ТЕОС + 5 мл  $\text{H}_2\text{O}$  при безперервному перемішуванні. При розшаруванні ( $\approx$  через 20 хв. після початку перемішування) додавали 20 мл етанолу. Перемішували протягом 2 год. Знову додавали 9 мл спирту. До зволоженого магнетиту додавали одержаний реагент. Диспергували ультразвуком протягом 10 хв.

*Модифікування поверхні частинок магнетиту тетрабутоксититаном. Одержання нанокompозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ .*

Для одержання нанокompозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$  як модифікуючий агент використовували *n*-бутилортотитанат [20]. Запропонована методика базується на реакції перетворення *n*-бутилортотитанату на поверхні магнетиту в  $\text{TiO}_2$ . Це перетворення складається з таких процесів: гідролізу *n*-бутилортотитанату; наступної конденсації продуктів гідролізу з утворенням полімерів; руйнування полімеру при підвищенні температури з утворенням аморфного  $\text{TiO}_2$ .

Процеси гідролізу алкілортотитанатів та їх полімеризації описані в [23]. Слід зазначити, що реакція гідролізу проходить достатньо швидко. Ступінь полімеризації і будова полімерів в значній

мірі залежить від співвідношення ортотитанату та води, яка потрібна для досягнення бажаного ступеню гідролізу, умов проведення гідролізу, каталізаторів тощо.

На першій стадії модифікування порошок магнетиту обробляли 25% розчином *n*-бутилортотитанату в безводному бутанолі і проводили ретельне перемішування в ультразвуковому диспергаторі УЗДН-2. В процесі змішування відбувається перехід золь фракції продуктів гідролізу *n*-бутилортотитанату в гель. Диспергували в ультразвуковому диспергаторі.

#### *Імобілізація доксорубіцину.*

Імобілізацію ДР на поверхнях магнетиту Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> та наноструктур 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>/ГА здійснювали адсорбційним методом із середовища фізіологічного розчину. Особливості експериментальних методик адсорбційної імобілізації доксорубіцину на поверхні наноструктур, отримання нанокompозитів Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/доксорубіцин, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ГА/ДР та їх властивості наведено в [19].

#### *Дослідження біоактивності та біосумісності нанокompозитів.*

Біоактивність та біосумісність нанокompозитів визначали за життєздатністю дріжджових клітин цитохімічним методом із застосуванням методу оптичної мікроскопії (біологічний мікроскоп типу Bresser Erudit MO 20x-1536x) та барвника метиленового синього [24, 25] шляхом реєстрації зміни їх концентрації у суспензіях, що містили вказані нанокompозити, клітини дріжджів, мінімальне синтетичне живильне середовище (МСЖС) [18] та фізіологічний розчин. Чисельно життєздатність (*L*) оцінювали за формулою:  $L = M_1/(M_1 + M_2) \cdot 100\%$ , де *M*<sub>1</sub> – кількість живих клітин, *M*<sub>2</sub> – кількість загиблих клітин. Отримані дані порівнювали з результатами досліджень контрольних зразків (серії 1, 2).

Загалом досліджено зразки таких серій:

1 - суспензія дріжджових клітин (початкова концентрація ( $n_0 \approx 2,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) у фізіологічному розчині з МСЖС;

2 - суспензія фізіологічного розчину та вихідного нанорозмірного однодомного магнетиту (170 мкг/мл), що містила клітини дріжджів ( $n_0 \approx 2,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) та МСЖС;

3 - суспензія дріжджових клітин ( $n_0 \approx 2,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) у фізіологічному розчині, що містила МСЖС та нанокompозити Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ДР (маса імобілізованого доксорубіцину в зразку (*M*<sub>ДР</sub>) становила 0,7 мг);

4 - суспензія фізіологічного розчину та нанокompозитів Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ГА/ДР (*M*<sub>ДР</sub> = 0,6 мг) з клітинами дріжджів ( $n_0 \approx 3,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) та МСЖС;

5 - суспензія фізіологічного розчину та нанокompозитів Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/ДР (*M*<sub>ДР</sub> = 0,7 мг) з клітинами дріжджів ( $n_0 \approx 2,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) та МСЖС;

6 - суспензія фізіологічного розчину та нанокompозитів Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>/ДР (*M*<sub>ДР</sub> = 0,8 мг) з клітинами дріжджів ( $n_0 \approx 3 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) та МСЖС.

Всі досліджені зразки містили 1,3 мл фізіологічного розчину (0,9 % NaCl) та 1 мл мінімального синтетичного середовища в якості живильної речовини. Маса клітин дріжджів становила 0,5 мг (аналітичні ваги ВЛА-200). Наночастинки магнетиту, нанокompозити та клітини дріжджів у суспензіях відповідних серій зразків приводили в контакт струшуванням.

Кількість клітин для кожного із зразків відповідних серій підраховували методом світлової мікроскопії із застосуванням камери Горяєва після початку досліду, через 16 годин та через 3,5 доби. Досліджували по три зразки кожної серії, для отримання статистично достовірних результатів підрахунок кількості клітин проводили у 5-7 великих квадратах камери, результати усереднювали.

Концентрацію клітин (*n*, мл<sup>-1</sup>) підраховували за формулою:  $n = N \cdot 2,5 \cdot 10^5$ , де *N* – кількість клітин над великим квадратом камери Горяєва.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Спочатку в суспензіях спостерігалось явище аглютинації нанокompозитів на поверхні клітин та утворення агрегатів із нанокompозитних частинок (рис. 2-6, а). Після достатньо тривалого обережного струшування суспензії ставали однорідними. Дослідження проводили при *t*~22 °С. Встановлено, що при цій температурі за умов проведення дослідів у контролях відбувається відносно повільне зростання кількості клітин, що сприяло їх підрахунку.

Результати досліджень зміни концентрації клітин дріжджів у зразках наведено на рис. 1-6.

При дослідженні біоактивності доксорубіцину було експериментально встановлено, що його розчин у фізіологічній рідині призводить до майже повної загибелі клітин дріжджів (95%) в концентрації 0,5 мг/мл за 3,5 доби. В методиці на визначення цитотоксичності прийнято [26] користуватись дозою  $IC_{50}$ , за якої спостерігається загибель 50% клітин. Тому для тестування біоактивності кількість нанокompatитного матеріалу  $Fe_3O_4/ГА/ДР$  (~20 мг) з іммобілізованим доксорубіцином (~50 мг/г), який використовувався для утворення суспензії, вибиралась з розрахунку, щоб концентрація вивільненого ДР у дослідних суспензіях становила ~0,25 мг/мл.

Аналіз даних досліджень (рис. 1) свідчить, що в суспензіях клітин дріжджів ( $n_0 \approx 2,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) у фізіологічному розчині з поживною речовиною (контролі типу 1) спостерігається виражене збільшення їх кількості [27], яке призводило до зростання їх концентрації удвічі через 16 годин ( $5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>). В подальшому швидкість їх поділу сповільнювалась (можливо, через зменшення поживної речовини), однак, через 3,5 доби їх концентрація сягала  $\sim 10^8$  мл<sup>-1</sup>. Життєздатність дріжджових клітин в експериментах серії 1 суттєво не змінювалась і становила ~98-99%.

Аналіз даних досліджень, наведених на рис. 2, свідчить, що в суспензії фізіологічного розчину та вихідного нанорозмірного однодомного магнетиту (170 мкг/мл), яка містила клітини дріжджів ( $n_0 \approx 2,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) та поживну речовину (контролі типу 2), також спостерігається досить активний поділ, внаслідок якого концентрація клітин через 16 годин становила  $\sim 6,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>, а через 3,5 доби перевершувала  $10^8$  мл<sup>-1</sup>. Життєздатність клітин дріжджів, як і в попередньому випадку, на всіх стадіях досліджень зразків серії 2 становила ~98-99%. Наведені дані свідчать про біосумісність нанорозмірного однодомного магнетиту по відношенню до клітин дріжджів в умовах експерименту. Деяке перевищення швидкості клітинної проліферації в зразках серії 2 порівняно з попереднім випадком може бути пояснено ефектом малих доз [28], який полягає в стимулюванні життєдіяльності клітин у наслідок адсорбції продуктів метаболізму поверхнею магнетиту.

Зазначимо, що форма клітин у дослідях зі зразками серії 1 та 2 була округлою, поділ відбувався без особливостей.



Рис. 1. Зміна кількості клітин дріжджів у контролях серії 1: *a* – на початку досліджень, *б* – через 16 годин.

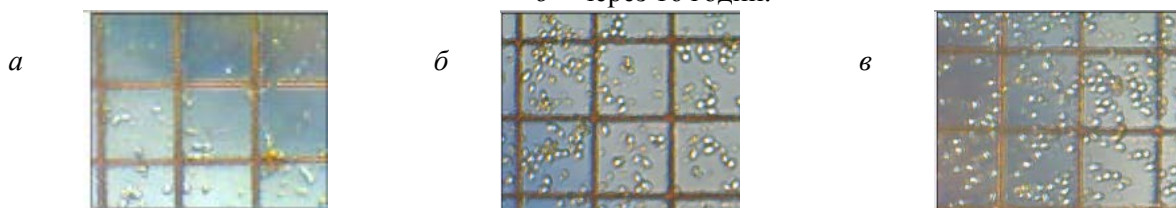


Рис. 2. Зміна кількості клітин дріжджів у контролях серії 2 (фізрозчин, клітини дріжджів, МСЖС, магнетит): *a* – на початку, *б* – через 16 годин, *в* – через 3,5 доби.

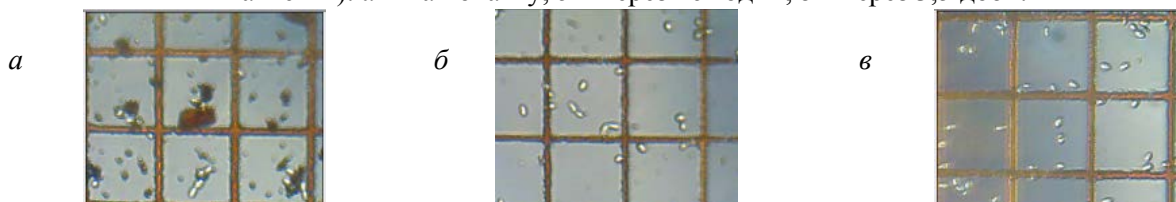


Рис. 3. Взаємодія нанокompatитів  $Fe_3O_4/ДР$  з клітинами дріжджів (серія 3): *a* – на початку, *б* – через 16 годин, *в* – через 3,5 доби.

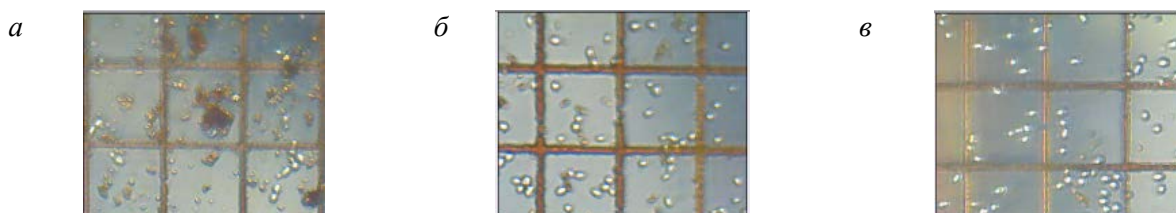


Рис. 4. Взаємодія нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{ДР}$  з клітинами дріжджів (серія 4): *a* – на початку, *б* – через 16 годин, *в* – через 3,5 доби.

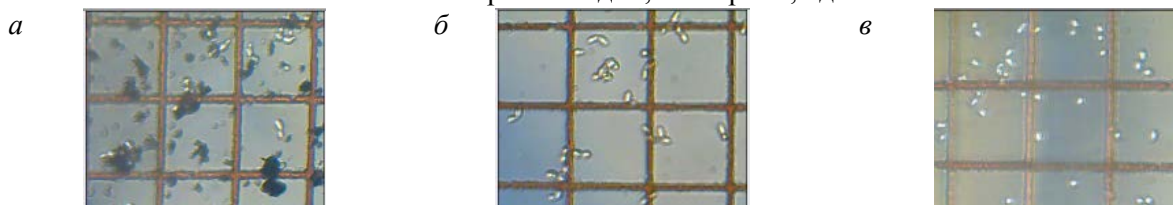


Рис. 5. Взаємодія нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ДР}$  з клітинами дріжджів (серія 5): *a* – на початку, *б* – через 16 годин, *в* – 3,5 доби.

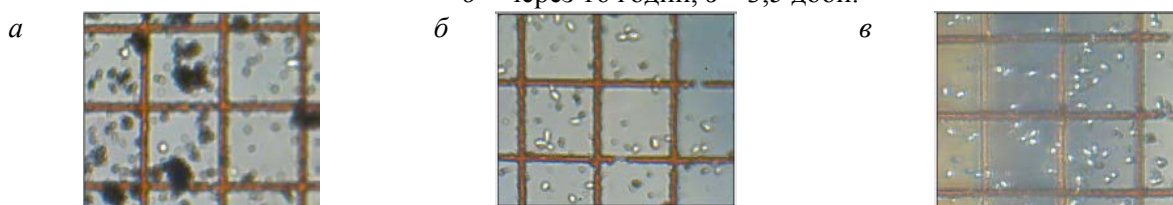


Рис. 6. Взаємодія нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{ДР}$  з клітинами дріжджів (серія 6): *a* – на початку, *б* – через 16 годин, *в* – 3,5 доби.

Результати досліджень свідчать (рис. 3), що наявність нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДР}$  (кількість іммобілізованого ДР в зразку 0,7 мг) у суспензіях дріжджових клітин ( $n_0 \approx 2,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>) у фізіологічному розчині з поживною речовиною (серія 3) призводить до істотного пригнічення клітинної проліферації. Так, через 16 годин концентрація клітин дріжджів практично не змінилася, лише через 3,5 доби їх кількість дещо зросла і становила  $\sim 3 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>.

Дослідженнями взаємодії суспензії фізіологічного розчину зразків серії 4, нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{ДР}$  (вміст ДР 0,6 мг), з клітинами дріжджів (рис. 4) також встановлено істотне пригнічення клітинної проліферації. Концентрація клітин дріжджів на початку експерименту становила  $\sim 3,5 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup> і практично не змінилася за 16 годин, лише через 3,5 доби їх кількість зросла до  $\sim 4 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>.

Подібне пригнічення проліферації клітин дріжджів спостерігалось також при їх взаємодії з нанокompatитами  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ДР}$  (вміст ДР 0,7 мг) та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{ДР}$  (вміст ДР 0,8 мг) у дослідях із зразками серій 5 та 6, відповідно. Зазначимо лише, що у випадку нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ДР}$  зростання кількості клітин дріжджів не спостерігалось навіть через 3,5 доби. Цей факт звертає на себе увагу, оскільки в роботі [29] повідомлялось про можливість синергічного впливу на метаболізм клітин антибіотика в присутності висодисперсного кремнезему. Вказаний синергізм може бути обумовлений утворенням на поверхні нанорозмірного  $\text{SiO}_2$  кластерів молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , які розпізнаються клітинами, внаслідок чого нанокompatити  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ДР}$  можуть мати кращу біодоступність і, відповідно, вищу біоактивність [30, 31].

Характерним для дослідів із зразками серій 3, 4, 5 та 6 було також те, що життєздатність дріжджових клітин з плином часу зменшувалась і складала  $\sim 85$  та  $75\%$ , відповідно, через 16 годин та 3,5 доби. Слід також зазначити, що при цьому спостерігалось зростання кількості значно збільшених клітин (аж до подвоєння розміру) видовженої форми, що не змогли поділитися, що свідчить про значні порушення клітинного циклу.

Наведені дані свідчать, що магніточутливі нанокompatити  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДР}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ДР}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{ДР}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{ДР}$  виявляють цитотоксичну та протипроліферативну активність по відношенню до клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, механізм якої є характерним для антибіотика антрациклінового ряду доксорубіцин.

Отримані результати можуть бути корисними для використання в розробках нових форм лікарських засобів спрямованої доставки.

## ВИСНОВКИ

Синтезовано нанокompозити  $Fe_3O_4/DP$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2/DP$ ,  $Fe_3O_4/TiO_2/DP$ ,  $Fe_3O_4/ГА/DP$ , вивчено їх цитотоксичну та протипроліферативну активність по відношенню до клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, механізм якої обумовлено характерним впливом антибіотика антрациклінового ряду доксорубіцину. На вибраних об'єктах відпрацьовано досить ефективну, надійну, безпечну та відносно недорогу методику доклінічного контролю цитотоксичної активності нанокompозитів, яка може бути актуальною для використання в розробках нових лікарських магнітокерованих засобів спрямованої доставки.

Роботу виконано при підтримці цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва» (проект 31/16).

### **Цитотоксическая активность магнитоуправляемых нанокompозитов на основе доксорубицина на примере клеток *Saccharomyces cerevisiae***

**С.П. Туранская<sup>1</sup>, А.П. Кусяк<sup>1</sup>, А.Л. Петрановская<sup>1</sup>, С.В. Горобец<sup>2</sup>, В.В. Туров<sup>1</sup>, П.П. Горбик<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, E-mail: sturanska@ukr.net

<sup>2</sup>Национальный технический университет Украины (КПИ)  
проспект Победы, 37, Киев, 03056, Украина

Синтезированы новые магниточувствительные нанокompозиты, содержащие современный противоопухолевый препарат доксорубицин. Исследована их биосовместимость и биоактивность. В частности, выяснено, что в количествах 0,6-0,8 мг доксорубицина/образец нанокompозиты оказывают цитотоксическое и антипролиферативное воздействие по отношению к модельным клеткам *Saccharomyces cerevisiae*. Показана перспективность использования этих нанокompозитов в онкологии.

**Ключевые слова:** наноразмерный однодоменный магнетит, нанокompозиты  $Fe_3O_4/доксорубицин$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2/доксорубицин$ ,  $Fe_3O_4/TiO_2/доксорубицин$ ,  $Fe_3O_4/гидроксипатит/доксорубицин$ , доксорубицин, дрожжевые клетки, цитотоксичность, пролиферация.

### **Cytotoxic activity of magnetocarried nanocomposites based on doxorubicin with example of *Saccharomyces cerevisiae* cells**

**S.P. Turanska<sup>1</sup>, A.P. Kussyak<sup>1</sup>, A.L. Petranovska<sup>1</sup>, S.V. Gorobez<sup>2</sup>, V.V. Turov<sup>1</sup>, P.P. Gorbyk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, E-mail: sturanska@ukr.net

<sup>2</sup>National Technical University of Ukraine (KPI)  
37 Prospekt Peremogy, Kyiv, 03056, Ukraine

The new magnetosensitive nanocomposites containing a modern antitumor drug doxorubicin were synthesized. We investigated their biocompatibility and bioactivity. In particular, it was determined that in quantities of 0,6-0,8 mg of doxorubicin/specimen, the nanocomposites had cytotoxic and antiproliferative activity with respect to model cells *Saccharomyces cerevisiae*. Prospects were shown for using these nanocomposites in oncology.



**Keywords:** *nanosized single-domain magnetite, nanocomposites Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/doxorubicin, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/doxorubicin, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>/doxorubicin, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/hydroxyapatite/doxorubicin, doxorubicin, yeast cells, cytotoxicity, proliferation.*

#### ЖИТЕПАТЯПА

1. *Levy L., Sahoo Y., Kim K.-S. et al.* Synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications // *Chem. Mater.* – 2002. – V. 14. – P. 3715.
2. *Nanomaterials and Supramolecular Structures. Physics Chemistry, and Applications* (Eds. Shpak A.P., Gorbyk P.P.) Springer, 2009. – P. 63.
3. *Gorbyk P.P., Chekhun V.F.* Nanocomposites of medicobiologic destination: reality and perspectives for oncology // *Functional materials.* – 2012. – V. 19, N 2. – P. 145–156.
4. *Advances in Semiconductor Research: Physics of Nanosystems, Spintronics and Technological Applications* (Eds. Adorno D.P., Pokutnyi S.) – New York: Nova Science Publishers, 2014. – Chapter 9. Magnetosensitive Nanocomposites with Functions of Medico-Biological Nanorobots: Synthesis and Properties. – P. 161–198. (P.P. Gorbyk, L.B. Lerman, A.L. Petranovska and S.P. Turanska).
5. *Davaran S., Alimirzalu S., Nejati-Koshki K. et al.* Physicochemical characteristics of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanocomposites based on poly(N-isopropylacrylamide) for anti-cancer drug delivery // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2014. – V.15, N 1. – P. 49–54.
6. *Anirudhan T.S., Sandeep S.* Synthesis, characterization, cellular uptake and cytotoxicity of a multi-functional magnetic nanocomposite for the targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells // *J. Mater. Chem.* – 2012. – V. 22. – P. 12888–12899.
7. *Sadighian S., Hosseini-Monfared H., Rostamizadeh K., Hamidi M.* pH-Triggered magnetic-chitosan nanogels (MCNs) for doxorubicin delivery: physically vs. chemically cross linking approach // *Adv. Pharm. Bull.* – 2015. – V. 5, N 1. – P. 115–120.
8. *Prylutska S.V., Didenko G.V., Potebnya G.P. et al.* Toxic effect of C<sub>60</sub> fullerene-doxorubicin complex towards normal and tumor cells *in vitro* // *Biopolym. Cell.* – 2014. – V. 30, N 5. – P. 372–376.
9. *Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O. et al.* C<sub>60</sub> fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment // *Drugs R D.* – 2014. – V. 14, N 4. – P. 333–340.
10. *Prylutska S.V., Korolovych V.F., Prylutsky Yu.I et al.* Tumor-inhibitory effect of C<sub>60</sub> fullerene complex with doxorubicin // *Nanomed. Nanobiol.* – 2014. – V. 1, N 2. – P. 1–5.
11. *Orel V.E., Mitrelias T., Tselepi M. et al.* Imaging of Guerin carcinoma during magnetic nanotherapy // *J. Nanopharmaceutics Drug Delivery.* – 2014. – V. 2. – P. 1–11.
12. *Panchuk R.R., Prylutska S.V., Chumak V.V. et al.* Application of C<sub>60</sub> fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo* // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2015. – V. 11, N 7. – P. 1139–1152.
13. *Afanasiyeva K.S., Prylutska S.V., Lozovik A.V. et al.* C<sub>60</sub> fullerene prevents genotoxic effect of doxorubicin on human lymphocytes *in vitro* // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – V. 87, N 1. – P. 91–98.
14. *Prylutska S., Skivka L., Didenko G. et al.* Complex of C<sub>60</sub> fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy // *Nanoscale Res. Lett.* – 2015. – V. 10, N 499. – P. 1–7.
15. *Orel V., Shevchenko A., Romanov A. et al.* Magnetic properties and antitumor effect of nanocomplexes of iron oxide and doxorubicin // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* – 2015. – V. 11, N 1. – P. 47–55.
16. *Kule C., Ondrejickova O., Verner K.* Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast // *Mol. Pharmacol.* – 1994. – V. 46, N 6. – P.1234–1240.

17. Patel S., Sprung A.U., Keller B.A. et al. Identification of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug doxorubicin: implications for the mechanisms of doxorubicin action and cytotoxicity // *Mol. Pharmacol.* – 1997. – V. 52, N 4. – P. 658–666.
18. Саенко Ю.В., Шутков А.М., Расторгуева Е.В. Доксорубин и менадион вызывают задержку клеточной пролиферации *Saccharomyces cerevisiae* с помощью различных механизмов // *Цитология.* – 2010. – Т. 52, № 5. – С. 407–411.
19. Петрановська А.Л., Абрамов М.В., Туранська С.П. та ін. Магнітні рідини на основі магнетиту і доксорубіцину для спрямованої доставки лікарського засобу // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – 2015. – Т. 6, № 3. – С. 343–353.
20. Кусяк А.П., Туранська С.П., Петрановська А.Л., Горбик П.П. Адсорбція цис-дихлордіамінплатини магніточутливими нанокompозитами Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) // *Инновационные пути решения актуальных проблем базовых отраслей, экологии, энерго- и ресурсосбережения. Казантип-Эко-2014. Сборник тр. XXII междунар. конф.* – Харьков, 2014. – Т. 1. – С. 37–42.
21. Семко Л.С., Горбик П.П., Сторожук Л.П. та ін. Модифікування магнетиту діоксидом кремнію // *Фізика і хімія твердого тіла.* – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 526–532.
22. Коваленко А.С., Гринь С.В., Ильин В.Г. Особенности темплатного синтеза мезопористых материалов на основе титано-кремниевых эфиров // *Теорет. и эксперим. химия.* – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 46–51.
23. Семко Л.С., Горбик П.П., Чуйко О.О. та ін. Модифікування магнетиту діоксидом титану та властивості одержаних нанокompозитів // *Доповіді НАН України.* – 2007. – № 2. – С. 150–157.
24. Туров В.В., Горбик С.П. Определение сил адгезии на межфазной границе клетка/вода из данных <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии // *Украинский химический журнал.* – 2003. – Т. 69, № 6. – С. 80–85.
25. Туров В.В., Горбик С.П., Чуйко А.А. Влияние дисперсного кремнезема на связанную воду в замороженных клеточных суспензиях // *Проблемы криобиологии.* – 2002. – № 3. – С. 16–23.
26. Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии, экологии (Под ред. Шпака А.П., Чехуна В.Ф.) Составители Горбик П.П., Туров В.В. – Киев: Наук. думка, 2011. – 444 с.
27. Бабаева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. – Т-во науч. изд. КМК, 2004. – 239 с. ISBN: 5-87317-179-3
28. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния (Под ред. Чуйко А.А.) – Киев: Наук. думка, 2003. – 417 с.
29. Туров В.В., Гулько В.М. Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев: Наук. думка, 2011. – 313 с.
30. Туранська С.П., Туров В.В., Гулько В.М., Богатирьов В.М. Асоціати води у частково зневоднених дріжджах і на поверхні гідрофобного кремнезему // *Хімія, фізика та технологія поверхні: Міжвід. зб. наук. пр. Ін-т хімії поверхні НАН України (Голов. ред. Чуйко О.О.)* – К.: Вид. дім «КМ Академія». – 2004. – Вип. 10. – С. 207–211.
31. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M. et al. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2005. – V. 283. – P. 329–343.

#### REFERENCES

1. Levy L., Sahoo Y., Kim K.-S., Bergey E.J., Prasad P. Synthesis and characterization of multifunctional nanoclusters for biological applications. *Chem. Mater.* 2002. **14**: 3715.
2. *Nanomaterials and supramolecular structures. Physics chemistry, and applications* (Eds. Shpak A.P., Gorbyk P.P.) (Springer, 2009, p. 63).



3. Gorbyk P.P., Chekhun V.F. Nanocomposites of medicobiologic destination: reality and perspectives for oncology. *Functional materials*. 2012. **19**(2): 145.
4. *Advances in semiconductor research: physics of nanosystems, spintronics and technological applications* (Eds. Adorno D.P., Pokutnyi S.I.) (New York: Nova Science Publishers, 2014. Chapter 9. Magnetosensitive nanocomposites with functions of medico-biological nanorobots: synthesis and properties. P. 161-198. (P.P. Gorbyk, L.B. Lerman, A.L. Petranovska and S.P. Turanska).
5. Davaran S., Alimirzalu S., Nejati-Koshki K., Nasrabadi H.T., Akbarzadeh A., Khandaghi A.A., Abbasian M., Alimohammadi S. Physicochemical characteristics of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanocomposites based on poly(N-isopropylacrylamide) for anti-cancer drug delivery. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2014. **15**(1): 49.
6. Anirudhan T.S., Sandeep S. Synthesis, characterization, cellular uptake and cytotoxicity of a multi-functional magnetic nanocomposite for the targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells. *J. Mater. Chem*. 2012. **22**: 12888.
7. Sadighian S., Hosseini-Monfared H., Rostamizadeh K., Hamidi M. pH-Triggered magnetic-chitosan nanogels (MCNs) for doxorubicin delivery: physically vs. chemically cross linking approach. *Adv. Pharm. Bull*. 2015. **5**(1): 115.
8. Prylutska S.V., Didenko G.V., Potebnya G.P., Bogutska K.I., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. Toxic effect of C<sub>60</sub> fullerene-doxorubicin complex towards normal and tumor cells *in vitro*. *Biopolym. Cell*. 2014. **30**(5): 372.
9. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O., Prylutsky Yu., Evstigneev M., Scharff P., Ritter U. C<sub>60</sub> fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs R D*. 2014. **14**(4): 333.
10. Prylutska S.V., Korolovych V.F., Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Ritter U., Scharff P. Tumor-inhibitory effect of C<sub>60</sub> fullerene complex with doxorubicin. *Nanomed. Nanobiol*. 2014. **1**(2): 1.
11. Orel V.E., Mitrelias T., Tselepi M., Golovko T., Nikolov N., Romanov A., Rykhalskiy A., Barnes C., Yaroshenko O., Orel I., Supruniuk I., Shchepotin I. Imaging of Guerin carcinoma during magnetic nanotherapy. *J. Nanopharmaceutics Drug Delivery*. 2014. **2**: 1.
12. Panchuk R.R., Prylutska S.V., Chumak V.V., Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Evstigneev M.P., Prylutsky Yu.I., Berger W., Heffeter P., Scharff P., Ritter U., Stoika R.S. Application of C<sub>60</sub> fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo*. *J. Biomed. Nanotechnol*. 2015. **11**(7): 1139.
13. Afanasieva K.S., Prylutska S.V., Lozovik A.V., Bogutska K.I., Sivolob A.V., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. C<sub>60</sub> fullerene prevents genotoxic effect of doxorubicin on human lymphocytes *in vitro*. *Ukr. Biochem. J*. 2015. **87**(1): 91.
14. Prylutska S., Skivka L., Didenko G., Prylutsky Yu., Evstigneev M., Potebnya G., Panchuk R., Stoika R., Ritter U., Scharff P. Complex of C<sub>60</sub> fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy. *Nanoscale Res. Lett*. 2015. **10**(499): 1.
15. Orel V., Shevchenko A., Romanov A., Tselepi M., Mitrelias T., Barnes C.H.W., Burlaka C.H.W., Lukin S., Shchepotin I. Magnetic properties and antitumor effect of nanocomplexes of iron oxide and doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015. **11**(1): 47.
16. Kule C., Ondrejickova O., Verner K. Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast. *Mol. Pharmacol*. 1994. **46**(6):1234.
17. Patel S., Sprung A.U., Keller B.A., Heaton V.J., Fisher L.M. Identification of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug doxorubicin: implications for the mechanisms of doxorubicin action and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol*. 1997. **52**(4): 658.
18. Saenko Yu.V., Shutov A.M., Rastorgueva E.V. Doxorubicin and menadione reduce cell proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *Cytology*. 2010. **52**(5): 407 [in Russian].

19. Petranovska A.L., Abramov M.V., Turanska S.P., Gorbyk P.P., Kussyak A.P. Magnetic fluids based on magnetite and doxorubicin for targeted delivery of drug. *Chemistry, Physics and Technology of Surface*. 2015. **6**(3): 343 [in Ukrainian].
20. Kussyak A.P., Turanska S.P., Petranovska A.L., Gorbyk P.P. Adsorption of *cis*-dichlorodiammineplatinum by magnetosensitive nanocomposites Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). *Novel ways to solve actual problems of basic fields, ecology, energy and resource preservation*. Kazantip-Eco-2014. XXII international conf. Khar'kov, 2014. **1**: 37 [in Ukrainian].
21. Semko L.S., Gorbyk P.P., Storozhuk L.P., Dz'ubenko L.S., Dubrovin I.V., Oranska O.I. Modification of magnetite with silicon dioxide. *Physics and Chemistry of Solids*. 2007. **8**(3): 526 [in Ukrainian].
22. Kovalenko A.S., Grin' S.V., Il'in V.G. Peculiarities of template synthesis of mesoporous materials based on titano-silicic ethers. *Theor. and Experim. Chemistry*. 2004. **40**(1): 46 [in Russian].
23. Semko L.S., Gorbyk P.P., Chuiko O.O., Storozhuk L.P., Dubrovin I.V., Oranska O.I., Revo S.L. Modification of magnetite with titanium dioxide and properties of the obtained nanocomposites. *Reports of NAS of Ukraine*. 2007. **2**: 150 [in Ukrainian].
24. Turov V.V., Gorbik S.P. Determination of adhesion powers at cell/water interface from the data of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Ukrainian chemical journal*. 2003. **69**(6): 80 [in Russian].
25. Turov V.V., Gorbik S.P., Chuiko A.A. Influence of dispersed silica on bound water in frozen cellular suspensions. *Cryobiology problems*. 2002. **3**: 16 [in Russian].
26. Gorbyk P.P., Turov V.V. *Nanomaterials and nanocomposites in medicine, biology, ecology* (Eds. Shpak A.P., Chekhun V.F.) (Kiev: Nauk. dumka, 2011) [in Russian].
27. Babaeva I.P., Chernov I.Yu. *Yeast biology* (T-vo of scien. edit. KMK, 2004) [in Russian]. ISBN: 5-87317-179-3
28. *Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide* (Ed. Chuiko A.A.) (Kiev: Nauk. dumka, 2003) [in Russian].
29. Turov V.V., Gun'ko V.M. *Clustered water and ways of its using* (Kiev: Nauk. dumka, 2011) [in Russian].
30. Turanska S.P., Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M. Water associates in partly dehydrated yeast and on hydrophobic silica surface. *Chemistry, Physics and Technology of Surface* (Institute of Surface Chemistry of NAS of Ukraine, head ed. Chuiko O.O.) (Kiev: Vyd. dim «KM Academy», 2004). **10**: 207 [in Ukrainian].
31. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M., Zarko V.I., Gorbik S.P., Pakhlov E.M., Leboda R., Shulga O.V., Chuiko A.A. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005. **283**: 329.