

PACS numbers: 81.16.Be, 87.19.xj, 87.64.Bx, 87.85.J-, 87.85.Qr, 87.85.Rs, 87.85.St

Синтез, физико-химические свойства и биоактивность полифункциональных нанокompозитов для биологии и медицины

П. П. Горбик, А. Л. Петрановская, М. П. Турелик, Е. В. Пилипчук,
В. Ф. Чехун*, Н. Ю. Лукьянова*, А. П. Шпак**, В. Л. Карбовский**,
А. М. Кордубан**, В. В. Тришин***, Ю. Б. Шевченко***

*Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины,
ул. Генерала Наумова, 17,
03164 Киев, Украина*

**Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины,
ул. Васильковская, 45,
03022 Киев, Украина*

***Институт металлофизики им. Г. В. Курдюмова НАН Украины,
бульв. Акад. Вернадского, 36,
03680, ГСП, Киев-142, Украина*

****Институт ядерных исследований НАН Украины,
просп. Науки, 47,
03680, ГСП, Киев, Украина*

Выполнен комплекс работ, направленных на научное обоснование химического конструирования многоуровневых биосовместимых магниточувствительных полифункциональных нанокompозитов с иерархической архитектурой (моделей медико-биологических нанороботов), изучение их физико-химических свойств и биоактивности *in vitro* на клеточных линиях MCF-7. Изучены процессы иммобилизации на поверхности нанокompозитов биологически активных молекул с цитотоксическими свойствами, моноклональных антител CD 95 с иммунотерапевтическими и сенсорными свойствами. Исследованы возможности целевой доставки фармпрепаратов за счёт распознавания специфических клеток моноклональными антителами, проанализировано влияние полученных моделей нанороботов на онкоклетки карциномы молочной железы человека (линия MCF-7). Приведены основные результаты по указанным этапам исследований, позволяющие оценить современное состояние разработки и перспективы её практического использования. С целью решения задачи прицельной доставки терапевтических препаратов в методе нейтронозахватной терапии синтезированы и изучены магниточувствительные нанокompозиты, содержащие бор. Разработана методика синтеза магниточувствительных наноструктур на осно-

ве нанокристаллического магнетита, содержащего гадолиний.

Виконано комплекс робіт, спрямованих на наукове обґрунтування хемічного конструювання багаторівневих біосумісних магнеточутливих поліфункціональних нанокомпозитів з ієрархічною архітектурою (моделів медично-біологічних нанороботів), вивчення їх фізико-хімічних властивостей та біоактивності *in vitro* на клітинних лініях MCF-7. Вивчено процеси іммобілізації на поверхні біологічно активних молекул з цитотоксичними властивостями, моноклональних антитіл CD 95 з імунотерапевтичними і сенсорними властивостями. Досліджено можливості прицільного доставляння фармацевтичних препаратів за рахунок розпізнавання специфічних клітин моноклональними антитілами, проаналізовано вплив одержаних моделів нанороботів на онкоклітини карциноми молочної залози людини (лінія MCF-7). Наведено основні результати за вказаними етапами досліджень, що дозволяють оцінити сучасний стан розроблення та перспективи їх практичного використання. З метою вирішення задачі прицільного доставляння терапевтичних препаратів у методі нейтронозахоплювальної терапії синтезовано та вивчено магнеточутливі нанокомпозити, що містять бор. Розроблено методику синтезу магнеточутливих наноструктур на основі нанокристалічного магнетиту, що містить гадоліній.

The complex of experiments directed to the development of the scientific basis of chemical construction of multilevel biocompatible polyfunctional nanocomposites with hierarchical architecture (models of biomedical nanorobots), a study of their physical and chemical properties, bioactivity *in vitro* on the cell lines MCF-7 is completed. The processes of surface immobilization of biologically active nanocomposites of molecules with cytotoxic properties and monoclonal antibodies CD 95 with immunotherapeutic and sensory properties are studied. The possibilities of targeted delivery of pharmaceuticals are verified using the detection abilities of monoclonal antibodies. The influence of the synthesized models of nanorobots on the cancer cells of human breast carcinoma (MCF-7 line) is analysed. The main results of the research work are described for the estimation of the current state of development and the prospects of its practical usage. In order to solve the problems of the targeted delivery of therapeutic drugs for the method of neutron-capture therapy, the magnetosensitive boron-containing nanocomposites have been synthesized. The technique of magnetosensitive nanostructures synthesis on the base of gadolinium-containing nanocrystalline magnetite is developed.

Ключевые слова: магнитоуправляемые нанокомпозиты, магнетит, цитостатик, моноклональные антитела, наноробот, нейтронозахватная терапия.

(Получено 19 октября 2010 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень нанотехнологий позволяет создавать уникальные средства для медицины и биологии. Внедрение таких технологий в практику является основой современного прогресса в областях диа-

гностики и терапии, в частности на клеточном и геномных уровнях.

Внимание исследователей к композитам, содержащим магнитные наночастицы, обусловлено тем, что они имеют специфические свойства, нехарактерные для сплошного магнитного материала. Наблюдаются отличия до сотен градусов в температурах Кюри или Нееля, а также ряд необычных свойств — гигантское магнитосопротивление, аномальный магнитокалориметрический эффект и т.п.

К перспективным направлениям использования магнитных материалов с развитой поверхностью относится создание сорбентов, магниточувствительных наноконструкций для направленного транспорта лекарственных средств. В последние годы в качестве альтернативного направления приоритет приобрели работы в области создания «наноклиник» — многоуровневых магниточувствительных наноконструкций, обладающих комплексом функций, характерных для нанороботов, включающих распознавание специфических микробиологических объектов в биологических средах, целевую доставку лекарственных препаратов в органы- или клетку-мишени, диагностику и терапию заболеваний на клеточном или геномных уровнях, адсорбцию продуктов распада клеток после воздействия терапевтического препарата или гипертермии, их удаление из организма с помощью магнитного поля и т.п. [1].

При модифицировании поверхности носителей биосовместимыми полимерами необходимо оптимизировать функции полимерной составляющей. Полимерные молекулы могут выступать в этих системах в роли связующего для терапевтического или диагностического препарата, в то же время определяя характеристики лекарства: растворимость, биодоступность, пролонгированность действия за счёт медленной десорбции лекарственных препаратов из полимерной матрицы, срок хранения и др. Способы закрепления фармакологически активных веществ на поверхности полимера также могут быть различными, что определяется назначением лекарства и клинической патологией, в условиях которой они применяются.

Химиотерапевтические противоопухолевые лекарственные средства в живом организме вызывают нарушение обмена нуклеиновых кислот, препятствуют процессам биосинтеза и функции ДНК, угнетают кроветворение, пищеварение, являются кардио-, нейро- и нефротоксичными. Поэтому задача направленного транспорта лекарственного средства в клетки опухоли с помощью магнитных носителей чрезвычайно актуальна. Их фиксация и депонирование магнитным полем в зоне опухоли даёт возможность значительно уменьшить терапевтическую дозу препарата и, как следствие, свести к минимуму токсико-аллергические реакции организма.

Использование моноклональных антител в онкологической практике относят к методам пассивной иммунотерапии. Клинические данные свидетельствуют о безусловной эффективности пассивной иммунотерапии, по результатам сравнимой с химиотерапией, притом, что

уровень её токсичности значительно ниже. Комбинированное использование иммуно- и химиотерапии считается наиболее перспективным, поскольку значительно расширяет возможности лечения современными препаратами и способствует повышению их эффективности [2].

Исследования, направленные на разработку магнитоуправляемых лекарственных препаратов химиотерапевтического, диагностического и гипертермического действия, широко ведутся в развитых странах мира. Особенно актуальны работы, направленные на диагностику и терапию онкозаболеваний на клеточном уровне, что и обусловило выбор направления данного исследования.

Цель настоящей работы — научное обоснование и экспериментальная отработка всех основных этапов химического конструирования магниточувствительных нанокомпозитов с иерархической архитектурой для применения в медицине и биологии; анализ особенностей синтеза, физико-химических свойств и биоактивности нанокомпозитов на клеточных линиях карциномы молочной железы человека; анализ перспективности их использования для осуществления ряда терапевтических функций *in vivo*.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Создание биосовместимого покрытия на поверхности наноразмерного магнетита

Покрытие наночастиц может состоять из различных полимерных органических либо неорганических материалов. Разнообразные поверхностно-активные вещества, такие как олеат натрия, додециламин, натрийкарбоксилат метилцеллюлоза, также используются для увеличения дисперсности наноразмерных частиц в водной среде.

Наночастицы, предназначенные для транспорта лекарственных средств, должны иметь гидрофильную поверхность и размеры, меньше 60 нм. Одним из возможных подходов к увеличению времени циркуляции наночастиц в кровотоке является покрытие их гидрофильными полимерами типа полиэтиленгликоль (ПЭГ), что предотвращает агрегацию и минимизирует или вовсе устраняет адсорбцию белка, а так же делает частицу «невидимой» для клеток иммунной системы.

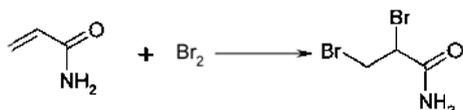
Одним из перспективных способов формирования покрытия на поверхности наноматериалов является полимеризация в плазме. Поскольку при этом используют электрический разряд при низком давлении, как правило, употребляется термин «полимеризация в тлеющем разряде». Процесс формирования покрытий полимеризацией в плазме объединяет в себе все функциональные стадии образования полимера и проходит, по сути, в течение одного этапа. Следует отметить, что химические реакции в плазме, как правило, носят сложный поэтапный характер и протекают через промежуточные состояния

возбужденных молекул, тогда как обычные химические реакции не проходят по такому механизму, либо проходят с низким выходом.

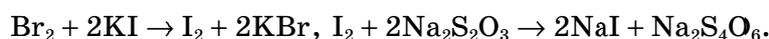
Макро- и микроскопические характеристики тлеющего разряда обеспечивают высокоэффективную генерацию радикалов мономерных молекул в элементарных процессах роста при полимеризации. Процессы переноса заряженных частиц в тлеющем разряде играют важную роль при полимеризации на поверхности, а именно, в образовании активного центра роста цепи. Сведения о характере иницирования реакций, образовании новой фазы в объеме и на поверхности с участием активных частиц важны для описания процессов получения пленок в тлеющем разряде, их структуры и свойств.

Модифицирование поверхности магнетита полиакриламидом. Полиакриламидный слой на поверхности частиц магнетита получали полимеризацией акриламида с *N,N'*-метилен-бис-акриламидом в плазме тлеющего ВЧ-разряда [7, 8]. Анализ кинетических кривых титрования двойных углерод-углеродных связей свидетельствует о полной полимеризации слоя акриламида в течение 2 минут [3].

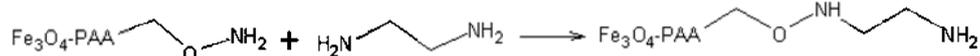
Определение степени конверсии мономера методом Кауфмана выполнено по реакции:



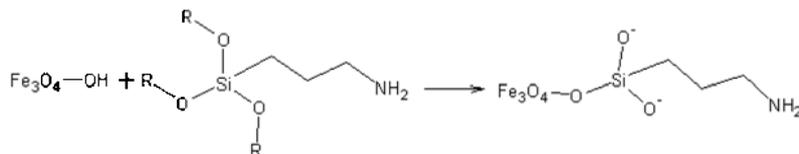
Избыток брома при взаимодействии с KI выделяет йод, который оттитровывали тиосульфатом натрия:



Поверхность полиакриламидного слоя, активировали этилендиамином для образования реакционноспособных-NH₂ групп на поверхности. Активацию осуществляли по реакции:



Модифицирование поверхности магнетита γ-аминопропилтриэтоксисиланом. Модифицирование поверхности наночастиц магнетита выполняли жидкофазным способом полимеризацией γ-аминопропилтриэтоксисилана в толуоле. В результате реакции поверхность магнетита приобретала основные свойства за счёт прививки γ-аминопропильных групп:



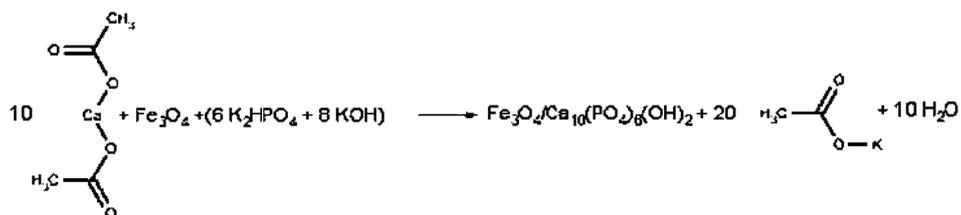
Полученные модифицированные образцы исследовались методами дериватографии, рентгеноструктурного анализа и ИК-фурье-спектроскопии.

Интенсивный дублет полосы поглощения при 1037 и 1130 см^{-1} приблизительно одинаковой интенсивности свидетельствовал об образовании на поверхности магнетита силоксановых связей Si–O–Si.

После модифицирования магнетита прививкой к поверхности γ -аминопропильных групп по данным рентгенофазового анализа структурных преобразований магнетита не происходило. Содержание аминопропильных групп рассчитывали по потере массы в интервале 450–1010 К с учетом присутствия в пробе физически адсорбированной воды. Концентрация аминопропильных групп составляет 24 $\mu\text{моль}/\text{м}^2$ [4].

Модифицирование поверхности магнетита гидроксиапатитом.

С целью придания магниточувствительным носителям высокой биосовместимости разработана методика синтеза нанокompозитов на основе нанокристаллических магнетита и гидроксиапатита. Синтез гидроксиапатитового покрытия выполнялся из раствора ацетата кальция по реакции:



Синтезированные образцы исследованы методами ИК-фурье-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, изучены их состав и структура. Установлено, что фаза гидроксиапатита характеризуется соотношением Ca/P = 1,7, что соответствует стехиометрии реакции его образования. Средний размер кристаллитов магнетита и гидроксиапатита рассчитывали согласно рентгеновским дифракционным пикам, с использованием формулы Шеррера.

Толщина слоя гидроксиапатита на поверхности наночастиц магнетита определена по соотношению площади Fe2p-/Fe3p-линий и равна ~ 4 нм (оценено по приросту массы нанокompозита, которая составила ~ 30%).

Поскольку ацетат калия, являющийся сопутствующим продуктом реакции наряду с нанокompозитом магнетит/гидроксиапатит, абсолютно безвреден для организма, гидроксиапатит, полученный данным способом, является перспективным материалом для применения в медицине и биологии. Синтезированные образцы исследованы с помощью рентгенофазового анализа; подтвержден состав и структура нанокompозита.

2.2. Создание модели магнитоуправляемого наноробота

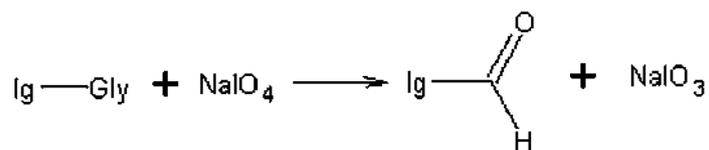
Иммобилизация цитостатического препарата. Следующим этапом создания магниточувствительного биосовместимого нанокompозита для осуществления ряда терапевтических функций, является иммобилизация цитотоксического препарата на поверхности частиц. Одним из наиболее эффективных цитостатиков, применяющихся в онкологии, является цисплатин (ЦП), в составе которого имеется платина. Механизм противоопухолевого действия препаратов, содержащих платину, связан с бифункциональным алкилированием цепей ДНК, вызывающим угнетение биосинтеза нуклеиновых кислот и апоптоз клеток. Стабильность цитостатика исследовалась на клеточной культуре в течение 10, 20, 30 суток. Установлено, что цитотоксическая активность цисплатина сохраняется на протяжении одного месяца [3].

Исследовалась кинетика адсорбции ЦП на поверхности нанокompозитов. Показано, что количество адсорбируемого цисплатина (по Pt^{2+}) на поверхности нанокompозита $Fe_3O_4/ПAA$ составило 128 мг/г, на $Fe_3O_4/\gamma\text{-АПC}$ = 98,3 мг/г, на $Fe_3O_4/ГА$ = 60,1 мг/г. Основная часть цитостатика адсорбировалась в течение первых 2–3 часов. Измерения выполняли на однолучевом двухканальном атомно-абсорбционном спектрофотометре С-115 М1 с пламенным атомизатором, дейтериевым корректором фона и цифровой регистрацией. Использовалась лампа с полым катодом на платину, аналитическая линия — 265,9, топливно-окислительная система: ацетилен–воздух [5].

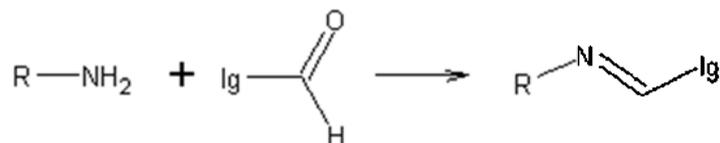
Иммобилизация моноклональных антител CD 95 на поверхности нанокompозитов. Методика ковалентного связывания антитела с нанокompозитом состояла во взаимодействии альдегидных групп, образующихся на молекулах гликопротеина в результате периодатного окисления боковых карбогидратных цепочек, с аминогруппами модификатора поверхности носителя. При этом образуются основания Шиффа (имины). Ковалентное присоединение антител этим методом к поверхности носителей имеет преимущество по сравнению с другими и заключается в том, что происходит ориентированное закрепление молекул антитела, фрагментом F_c к поверхности, тогда как F_{ab} фрагмент остаётся свободным и ориентирован наружу.

Изучены неспецифическая (физическая) адсорбция и ковалентное присоединение моноклонального антитела CD 95 на поверхности нанокompозитов: магнетит/полиакриламид ($Fe_3O_4/ПAA$), магнетит/ γ -аминопропилсилоксан ($Fe_3O_4/\gamma\text{-АПC}$), магнетит/гидроксиапатит ($Fe_3O_4/ГА$). В качестве сенсорных молекул использовалось моноклональное мышечное антитело CD 95 против Fas-антигена человека типа IgG1, карра, клоны DX2 производства DakoCytomation (Дания).

Окисление антитела для формирования альдегидной функциональной группы проводили $NaIO_4$ в ацетатном буфере по реакции:



Проведение, собственно, ковалентной иммобилизации антитела на поверхность нанокompозита осуществляется с образованием основания Шиффа:



Количество адсорбированного вещества определяли измерением концентрации антител в контактных растворах до и после адсорбции на комбинированном ридере для микропланшета Synergy HT, Model SIAFRTD, Serial Number 202993 (Bio Tek) по методу Бредфорда. В основу метода положен сдвиг спектра поглощения красителя Кумаси (Coomassie Blue) G-250 на длине волны 595 нм при образовании им комплекса с гликопротеином. Концентрацию антитела измеряли по калибровочному графику и рассчитывали адсорбцию моноклональных антител на поверхности исследуемых нанокompозитов (табл. 1).

Экспериментально показано, что ковалентное присоединение имеет существенные преимущества в сравнении с неспецифической адсорбцией на нанокompозитах с поверхностью, функционализированной NH_2 -группами. В результате образования ковалентной связи возрастает термодинамическая устойчивость иммобилизованного слоя и кинетическая устойчивость, вследствие замедления процесса десорбции иммуноглобулина за счет медленного гидролиза оснований Шиффа.

Показано, что величина физической адсорбции гликопротеина на гидроксипатитовом носителе существенно превышает величину как физически, так и ковалентноиммобилизованных антител на поверхности Fe_3O_4 , функционализированного аминогруппами. Высокая ад-

ТАБЛИЦА 1. Количественные характеристики иммобилизации моноклональных антител CD 95.

Нанокompозит	C_0 , мкг/мл	A(CD 95), мкг/г
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА} + \text{CD 95}$	20,00	590 физическая
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС} + \text{CD 95}$	20,00	1,2 физическая
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА} + \text{CD 95}$	20,00	2,3 физическая
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС} + \text{CD 95}_{\text{окисл.}}$	3,88	137,7 ковалентная
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА} + \text{CD 95}_{\text{окисл.}}$	3,88	163,2 ковалентная

сорбционная ёмкость поверхности $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ может быть объяснена сложным механизмом адсорбции гликопротеина, который включает анионный и катионный обмен. Ca^{2+} взаимодействует с карбоксилатными остатками поверхности антитела, тогда как PO_4^{2-} взаимодействует с основными участками молекулы. Значительное влияние на механизм адсорбции белка осуществляет рН среды, из которой происходит адсорбция. Корреляция рН среды с рI адсорбтива обуславливает конформацию адсорбированных молекул.

Учитывая значительную величину адсорбции антител на поверхности $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$, по сравнению со значениями адсорбции на поверхности наноконпозитов, функционализированных аминоклруппами, можно сделать предположение об образовании плотной ориентированной упаковки молекул CD 95 на поверхности наноконпозита, модифицированного ГА, а именно Fc фрагментом к поверхности, тогда как Fab фрагмент остаётся неизменным и ориентированным наружу. Это подтверждено совместными с ИЭПОР им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины исследованиями на клеточных линиях иммунотерапевтического влияния биофункционализированных наноконпозитов. Их цитотоксическое действие превышало действие контрольных доз антител в 2,7 раза. Кроме того, иммобилизованные антитела на поверхности ГА характеризовались слабой десорбцией в модельных биологических средах.

Следует отметить, что при распознавании специфического микробиологического объекта в биологической среде, например, клетки, магниточувствительный носитель сенсора находится в непосредственной близости от неё, либо проникает через мембрану во внутриклеточное пространство. При этом имеется реальная возможность точного определения ее пространственного местонахождения, и наблюдения магниторезонансными методами за перемещением конпозита во времени. Применяя методы компьютерной томографии, можно визуализировать этот процесс и получить объёмные изображения. Последнее особенно важно для ранней диагностики заболеваний и установления точных размеров опухоли [6, 7].

2.3. Исследование цитотоксического эффекта моделей нанороботов

Изучено влияние магниточувствительных наноконпозитов с адсорбированным цитостатиком, конъюгированным моноклоналным антителом (моделей нанороботов), на жизнеспособность клеточной линии карциномы молочной железы человека MCF-7. Для сравнения изучалось действие наноконпозитов на жизнеспособность клеток с отдельно иммобилизованными моноклоналными антителами и цитостатиком [3, 4]. Модели магнитоуправляемых лекарственных препаратов цитотоксического действия были исследованы *in vitro*. Для контроля были использованы: чистая питательная среда;

ТАБЛИЦА 2. Данные биосовместимости синтезированных наноконпозитов.

Носитель	Контроль, %	Живые, %	Погибшие клетки, %
Fe ₃ O ₄	100	98	2
Fe ₃ O ₄ /γ-АПС	100	88	6
Fe ₃ O ₄ /ПАА	100	99	1
Fe ₃ O ₄ /ГА	100	100	0

цисплатин с концентрацией $C = 2,5$ мкг/мл, что соответствует четвертичной дозе биологического эквивалента эффективности IC_{25} ; моноклональное антитело CD 95 с $C = 0,2$ мкг/мл (доза, используемая при лечении, составляет 10–30 мкг/мл). Также были исследованы исходный магнетит и наноконпозиты магнетит/полиакриламид (Fe₃O₄/ПАА), магнетит/γ-аминопропилсилоксан (Fe₃O₄/γ-АПС), магнетит/гидроксиапатит (Fe₃O₄/ГА) (табл. 2).

Использование магнитных наноконпозитов, в состав которых входит противоопухолевый препарат и моноклональное антитело CD 95, сопровождалось синергическим эффектом цитотоксического действия (превышение общего действия контрольных доз препаратов цисплатина и антитела в 1,5 раза) (табл. 3). Установлено наличие значительного синергического эффекта в системе магнитный носитель–цисплатин–антитело. Из полученных результатов видно, что использование магниточувствительных наноконпозитов с адсорбированным цисплатином с концентрацией вдвое ниже терапевтического диапазона, конъюгированных моноклональным антителом CD 95 приводит к гибели 57% опухолевых клеток, что превышает действие контроля примерно на 50%. Этот синергический эффект можно объяснить рядом факторов. Во-первых, осуществлена адресная доставка комплекса цитостатик — моноклональное антитело к опухолевым клеткам благодаря наличию на их поверхности рецепторов. Цитотоксический эффект, собственно, цисплатина осуществляется через образование ковалентных связей молекул препарата с ДНК. Гибели клетки способствует травматическое действие наноконпозита на клеточную мембрану, что существенно улучшает проникновение лекарственного препарата через мембранный барьер. Бифункциональные продукты взаимодействия, так называемые ДНК-аддукты, блокируют репликацию, транскрипцию и, как следствие, клеточную пролиферацию. Во-вторых, система лиганд–рецептор играет важную роль в апоптозе злокачественных клеток. Связываясь со своим рецептором, антитело запускает иммунотерапевтический механизм, который приводит к апоптозу [3, 4].

ТАБЛИЦА 3. Данные биоактивности моделей нанороботов на основе магнетита.

Контроль сравнения	Количество погибших клеток, %									
	Эффект препарата	Fe ₃ O ₄ / γ-АПС+ЦП	Fe ₃ O ₄ / γ-АПС+CD 95	Fe ₃ O ₄ / γ-АПС+ЦП+ +CD 95	Fe ₃ O ₄ / ПАА+ЦП	Fe ₃ O ₄ / ПАА+CD 95	Fe ₃ O ₄ / ПАА+ЦП+ +CD 95	Fe ₃ O ₄ / ГА+ЦП	Fe ₃ O ₄ / ГА+CD 95	Fe ₃ O ₄ / ГА+ЦП+ +CD 95
Цисплатин (ЦП)	25	31			38			48		
Антитело CD 95	10		20			21			27	
ЦП+CD 95	40			46			57			57

Следовательно, использование магниточувствительных наноконструкций (нанороботов), в состав которых входит противоопухолевый препарат и моноклональное антитело CD 95, позволяет реализовать распознавание специфических клеток и достичь цитотоксического эффекта препарата при более низких концентрациях, уменьшая при этом токсическое воздействие препарата на организм в целом.

2.4. Наноконструкции для нейтронзахватной терапии

Метод нейтронзахватной терапии основан на селективном накоплении изотопов ^{10}B , ^{157}Gd в раковых клетках и их взаимодействии с тепловыми нейтронами. Энергия γ -кванта, который выделяется при захвате нейтрона ядром атома бора составляет 17% от общей выделяемой энергии, поэтому основное воздействие на раковую клетку оказывают осколки: α -частицы и ядра лития ^7Li . Поскольку длина свободного пробега осколков сопоставима с размерами клетки, а сечение захвата тепловых нейтронов ядер ^{10}B на 4–7 порядков больше, чем углерода, водорода, кислорода и азота, входящих в состав клетки, здоровые ткани организма практически не повреждаются.

Изотоп ^{157}Gd имеет рекордное (255000 барн) сечение захвата нейтронов, высокий (98%) выход конверсионных и Оже-электронов. Перспективным представляется использование соединений, одновременно содержащих бор и гадолиний.

В качестве одного из перспективных способов обеспечения селективности накопления ^{10}B или ^{157}Gd на тканевом уровне нами рассматривается использование нейтронзахватных агентов в составе магнитной жидкости. С этой целью разработаны методики получения борсодержащих магнитных жидкостей на основе наноразмерного магнетита, стабилизированного мезо-2,3-димеркаптосукциновой кислотой; а также феррита гадолиния.

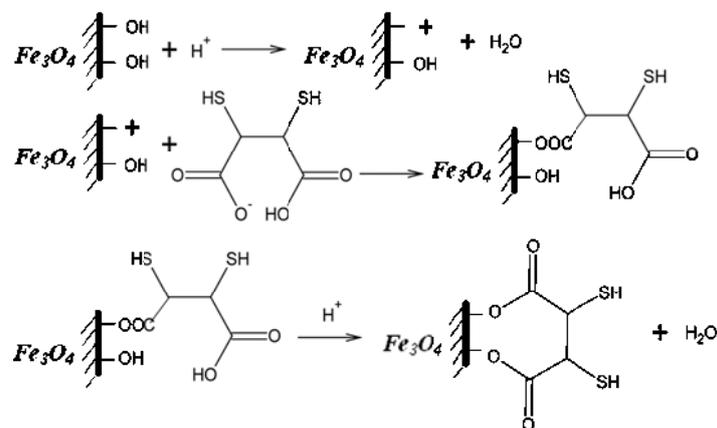
Модифицирование поверхности магнетита мезо-2,3-димеркаптосукциновой кислотой. Перспективными модифицирующими агентами магниточувствительных наночастиц являются соединения с тиольными функциональными группами, поскольку образование межмолекулярных дисульфидных мостиков значительно повышает прочность покрытия. Использование мезо-2,3-димеркаптосукциновой кислоты (DMSA) для формирования капсулы магниточувствительных частиц решает проблему стабильности коллоидной системы в водной среде, биосовместимости материала, и позволяет иммобилизацию необходимых соединений через тиольные и карбоксильные функциональные группы поверхности.

Биоактивность DMSA характеризуется способностью к образованию связей функциональных групп покрытия с ионами тяжёлых металлов и выведению их из организма. Тиольные группы, входящие в состав DMSA, способны к образованию связи с остатками ци-

стеина в молекулах белков крови, способствуя тем самым её облегчённому выведению из организма. Некоторые данные изучения *in vivo* кинетики покрытия клеточной мембраны магнитными наночастицами с оболочками на основе DMSA, подтверждают повышение (до 32,5%) степени их фагоцитоза клетками иммунной системы (макрофагами и нейтрофилами).

Тиольные группы DMSA обеспечивают формирование дисульфидных мостиков между адсорбированными молекулами и образование прочной полимерной нанокапсулы. Итак, покрытые DMSA магниточувствительные частицы являются перспективными носителями для проведения медико-биологических исследований.

С целью подготовки поверхности наночастиц магнетита к иммобилизации борсодержащих компонентов и последующего их применения в нейтронозахватной терапии, проведено модифицирование поверхности частиц *мезо*-2, 3-димеркаптосукциновой кислотой с образованием связи карбоксильной группы DMSA с гидроксильной группой поверхности:



DMSA формирует стабильное покрытие, дальнейшая стабилизация лигандной оболочки достигается образованием межмолекулярных дисульфидных связей между цепями, повышающих стабильность покрытия. Полученный водный золь наночастиц, покрытых DMSA, является стабильным в широких пределах pH (3–11) в фосфатных буферных системах. Свободные карбоксильные группы придают наночастице гидрофильные свойства. Свободные карбоксильные и тиольные группы могут использоваться для ковалентной посадки биологических лигандов.

Для подтверждения наличия связи DMSA с поверхностью магнетита, были выполнены ИК-фурье-спектроскопические исследования покрытия наночастиц и рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию. Анализ, выполненный по методу Кимболла–Крамера–Рида показал, что количество SH-групп в нанокompозите составляет

ТАБЛИЦА 4. Дзета-потенциал и усреднённый размер частиц магнитной жидкости Fe₃O₄-DMSA/вода согласно данным светорассеяния.

Дзета-потенциал, мВ	-40,3
Ширина распределения по дзета-потенциалам, мВ	9,84
Проводимость образца, мС/см	0,129
Усреднённый диаметр частиц, нм	40,5

0,0024 моль/г = 2,4 ммоль/г. При $S_{уд.} = 130 \text{ м}^2/\text{г}$ количество SH-групп — 0,019 ммоль/м².

Важнейшими характеристиками магнитной жидкости и любой дисперсной системы являются размер частиц и дзета-потенциал. Дзета-потенциал определяет возможность и скорость перемещения дисперсной фазы относительно дисперсионной, интенсивность электрокинетических явлений и устойчивость золь к деструкции дисперсных систем электролитами.

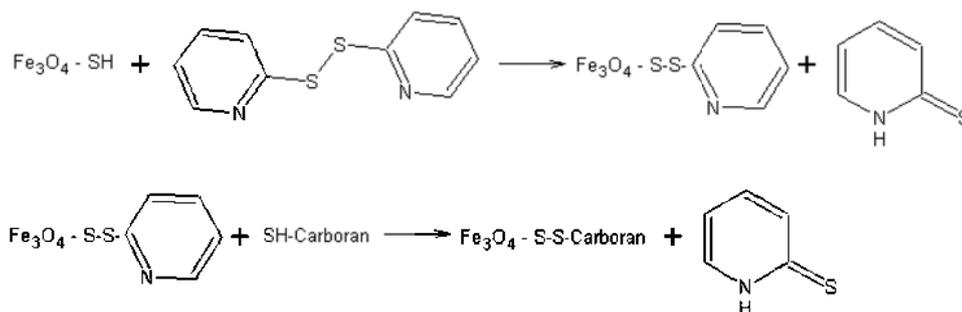
Исследовался дзета-потенциал и средний размер частиц синтезированной магнитной жидкости с помощью динамического светорассеяния. Выполнены измерения распределения частиц магнитной жидкости Fe₃O₄-DMSA/вода по дзета-потенциалу, результаты которых показано в табл. 4.

Результаты свидетельствуют о высоком отрицательном потенциале частиц при pH = 7, благодаря сильному электростатическому отталкиванию, препятствующему агрегации частиц в водной среде. При росте pH, дзета-потенциал уменьшается за счёт повышения степени ионизации COOH- и SH-функциональных групп.

Синтез карборансодержащих нанокмозитов по реакции тиол-дисульфидного обмена. Актуальным направлением создания нанокмозитов для нейтронозахватной терапии является иммобилизация борсодержащих соединений (карборанов) на поверхности магниточувствительных нанокмозитов, модифицированных биосовместимым покрытием с необходимыми функциональными группами.

Использование DMSA для формирования капсулы магниточувствительных частиц решает проблему стабильности коллоидной системы в водной среде, биосовместимости материала, и позволяет иммобилизацию необходимых соединений через тиольные и карбоксильные функциональные группы поверхности.

Иммобилизация на поверхность DMSA молекул *орто*-тиокарборана осуществлялась по реакции тиол-дисульфидного обмена с дипиридилдисульфидом. Пиридилдисульфиды (пиридилдитиолы) вступают в реакцию со свободными сульфогидрильными группами по реакции дисульфидного обмена в широком спектре pH с образованием дисульфидной связи:



Оптимальный для проведения реакции рН в пределах 6–9. Методами рентгеноструктурного анализа и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии показано наличие бора и –S–S–связей на поверхности нанокompозита.

Синтез Gd-содержащих нанокompозитов. Важной областью применения соединений гадолиния является нейтронозахватная терапия, при взаимодействии изотопов с эпитепловыми нейтронами, происходит образование γ -фотонов и электронов внутренней конверсии (индуцированная радиация), являющихся цитотоксичными. В ранних исследованиях для лечения меланомы и глиомы головного мозга использовали ^{10}B . Использованию гадолиния в терапевтических целях, несмотря на высокое сечение захвата нейтрона ядром ^{157}Gd , препятствовала высокая нефротоксичность (эффект, проявляющийся поражением почек) свободных, т.е. несвязанных в комплексы, неорганических солей гадолиния. Известно, что гадолинию свойственно наивысшее среди всех элементов сечение захвата тепловых нейтронов. Поэтому новый интерес к гадолинию в нейтронозахватной терапии возник в конце 1980-х годов в связи с введением в практику нашедших универсальное применение Gd-содержащих препаратов для магнитно-резонансной диагностики. Использование комплексных соединений гадолиния приводит к задержке роста опухоли в 2–3 раза. Это объясняется воздействием высокоэнергетических γ -фотонов и электронов внутренней конверсии на онкоклетки в организме.

В настоящей работе проведено создание нанокompозитных материалов на основе гадолиния. Модифицирование магнетита катионами гадолиния выполняли жидкофазным способом при помощи нитрата гадолиния. Состав и структуру полученных образцов исследовали методами спектроскопии, рентгеноструктурного анализа и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. Магнитные характеристики нанокompозитов исследовали с помощью вибрационного магнитометра. Синтез магнетита выполняли по следующей схеме:



В результате синтеза магнетита с солью нитрата гадолиния, по-

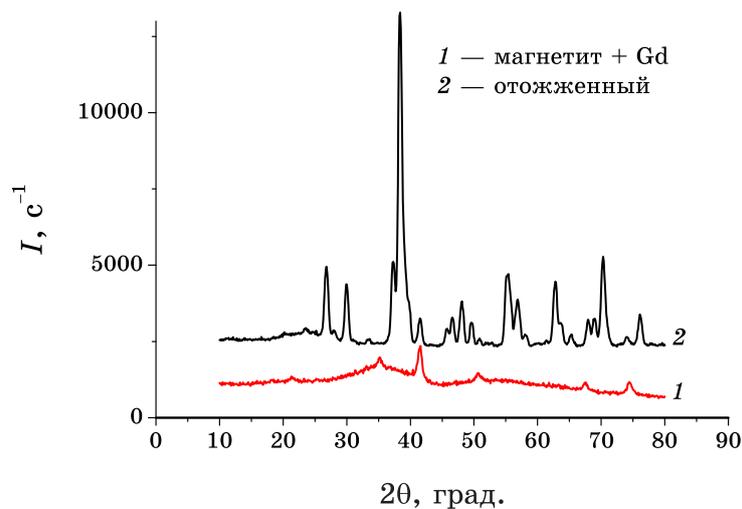


Рис. Дифрактограмма магнетита, модифицированного гадолинием.

лучены частицы с хорошими магнитными свойствами. На рентгенограмме отчётливо проявляется фаза магнетита, а также присутствует аморфная фаза (рис., кривая 1). Для достижения степени кристалличности, приемлемой для определения методом РФА, образцы отжигали при высоких температурах. После отжига при $T = 900\text{--}1000^\circ\text{C}$ на дифрактограмме (рис., кривая 2) наблюдаются пики при углах от 20 до 30° , которые относятся к кристаллической фазе GdFeO_3 (JCPDS № 47-67).

По результатам рентгенофазового анализа можно сделать вывод о том, что в процессе синтеза магнетита соосаждением с солью нитрата гадолиния при заданных условиях, образуются соединения типа $\text{Gd}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$, которые обладают хорошими магнитными свойствами. Далее, в процессе отжига при высоких температурах на воздухе происходит окисление и образуется парамагнитная фаза GdFeO_3 .

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы осуществлено научное обоснование актуальности и своевременности конструирования многоуровневых биосовместимых магниточувствительных полифункциональных нанокомпозигов с иерархической архитектурой (моделей медико-биологических нанороботов), изучения их физико-химических свойств и биоактивности *in vitro* на клеточных линиях рака. Выполнено детальное изучение способов иммобилизации сенсорных молекул на поверхность нанокомпозигов, а также биоактивных соединений различной природы (бор-, гадолинийсодержащих, цитостатиков), способ-

ных осуществлять необходимое терапевтическое воздействие на повреждённые ткани организма. Проанализировано влияние полученных моделей нанороботов на онкоклетки карциномы молочной железы человека (линия MCF-7). Направлениями дальнейших исследований могут быть: создание новых форм лекарственных препаратов, выполнение доклинических испытаний, разработка новейших магнитоуправляемых наноконструкций для нейтронозахватной терапии.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. M. C. Roco, R. S. Williams, and P. Alivisatos, *Nanotechnology Research Directions. Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade* (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 2002).
2. L. Levy, Y. Sahoo, Kyoung-Soo Kim, and J. Earl Bergey, *Chem. Mater.*, **14**: 3715 (2002).
3. *Физикохимия наноматериалов и супрамолекулярных структур* (Ред. А. П. Шпак, П. П. Горбик) (Киев: Наукова думка: 2007), т. 1.
4. *Nanomaterials and Supramolecular Structures. Physics, Chemistry, and Applications* (Eds. A. P. Shpak and P. P. Gorbyk) (Dordrecht, Netherlands: Springer: 2009), p. 63.
5. П. П. Горбик, А. Л. Петрановская, С. В. Горобец, Л. Ю. Куницкая, А. А. Васильева (Патент Украины № 81734 от 25.01.2008 г).
6. П. П. Горбик, А. Л. Петрановская, Д. Г. Усов, Л. П. Сторожук (Патент Украины №86322 от 10.04.2009 г).
7. П. П. Горбик, В. Н. Мищенко, А. Л. Петрановская, С. В. Горобец, А. А. Васильева, Н. В. Абрамов (Патент Украины № 91149 от 25.06.2010 г).