

СИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ В ОНКОТЕРАПІЇ НАНОКОМПОЗИТІВ НА ОСНОВІ ГЕМЦИТАБІНУ

С.П. Туранська, Н.М. Опанащук, А.Л. Петрановська, Н.В. Кусяк, Б.І. Тарасюк*,
С.В. Горобець*, В.В. Туров, П.П. Горбик, М.В. Абрамов

*Інститут хімії поверхні імені О.О. Чуйка НАН України, вул. Генерала Наумова, 17, Київ
03164, Україна, e-mail: phorbyk@ukr.net*

**Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені
Ігоря Сікорського», просп. Перемоги, 37, 03056, Київ, Україна*

Метою роботи є огляд наукових робіт, присвячених синтезу, дослідженням властивостей та застосуванням в медицині, зокрема онкотерапії, нанокмпозитів (НК) на основі гемцитабіну (ГЦ), перспективних для використання в методі адресної доставки.

Загально визнаною альтернативою традиційній хіміотерапії ГЦ є використання методів адресної доставки, що дозволяє створити терапевтичну дозу лікарського препарату у вогнищі захворювання, здійснити терапію при значно меншій його загальній дозі та мінімізувати токсико-алергічні реакції організму пацієнтів. Серед різноманіття сучасних методів адресної доставки лікарських препаратів та локальної терапії захворювань на рівні органів, клітин та генів, найвищого розвитку на цей час набули методи із застосуванням магніточутливих наноструктур, кон'югованих з протипухлинними засобами різного механізму дії.

На цей час обґрунтовано концепцію хімічного конструювання магніточутливих НК з багаторівневою ієрархічною наноархітектурою, що характеризуються функціями "наноклінік" та медико-біологічних нанороботів: розпізнавання мікробіологічних об'єктів у біологічних середовищах; цільової доставки лікарських препаратів до клітин та органів-мішеней і депонування; комплексної локальної хіміо-, імуно-, нейтронзахоплювальної, гіпертермічної, фотодинамічної терапії та магнітно-резонансної томографічної діагностики в режимі реального часу, детоксикації організму шляхом адсорбції решітків клітинного розкладу, вірусних частинок, іонів важких металів тощо та їх видалення за допомогою магнітного поля.

Для виготовлення магніточутливих поліфункціональних НК значний інтерес дослідників викликають наноструктури типу ядро-оболонка на основі однодоменного магнетиту (Fe_3O_4), які характеризуються унікальним комплексом фізичних, хімічних та біологічних властивостей, можливістю створення на їх основі магнітних рідин (МР), що містять онкологічні лікарські засоби різного функціонального призначення та механізмів дії.

Показано, що одна з основних проблем сучасної протипухлинної терапії гемцитабіном полягає в токсичності і слабкій biodostupnosti препарату. В останні роки значно зріс інтерес до використання природних механізмів ендоситозу та різного типу наноструктур для доставки лікарських препаратів до пухлин, із залученням лігандів, таких як гормони, вітаміни і фактори росту, спрямованих проти асоційованих з пухлинами рецепторів, які надлишково представлені на поверхні пухлинних клітин і мають обмежений розподіл у нормальних тканинах. На цей час методами сучасної нанотехнології активно розробляються магніточутливі та немагнітні кон'югати для

доставки ГЦ мішене-спрямованим способом до злякисних клітин, що дозволить зменшити його системну токсичність. Перевагою, яку надає застосування кон'югації лікарського препарату на поверхні наночастинок для доставки лікарських засобів *in vivo*, є повільне вивільнення препарату, що потенційно забезпечує більш тривалу присутність лікарського засобу в потоці крові на необхідному рівні. Позитивним результатом використання гіпертермії в поєднанні з вивільненням ліків може бути поліпшення стану пацієнта та зменшення частоти прийому ліків.

Незважаючи на значну кількість успішних досліджень щодо застосування магнітних наночастинок як тераностичного матеріалу, а також багаторазові успішні результати на малих тваринних моделях, до цього часу вони не задовольняють клінічні потреби. Однак, при досягненні високої ємності по відношенню до лікарського препарату, збільшенні специфічності і спорідненості до пухлинних клітин, поєднанні томографії та мультимодальної локальної терапії, магнітні наночастинок можуть стати зручними для клінічного використання в найближчому майбутньому і значно вплинути на ефективність лікування онкологічних захворювань.

Ключові слова: магнетит, нанокмпозити, гемцитабін, адсорбція, вивільнення.

Вступ

Онкологічні захворювання є однією з основних причин захворюваності і смертності в усьому світі. За останні 100 років за цими показниками онкопатологія перемістилася з десятого місця на друге, поступаючись лише хворобам серцево-судинної системи [1].

Хіміотерапевтичний препарат «Гемцитабін» [2] застосовують для лікування раку підшлункової залози, недрібноклітинного раку легень, раку сечового міхура, метастатичного раку молочної залози і прогресуючого або метастатичного раку яєчника. Гемцитабін (ГЦ) – (2-дезоксидифторцитидин монохлорид), молекулярна формула $C_9H_{11}F_2N_3O_4 \cdot HCl$, молекулярна вага 299,66, – синтетичний лікарський препарат, який за своєю структурою (рис. 1) є аналогом піримідинових основ. Випускається у вигляді ліофілізату для приготування розчину для ін'єкцій. ГЦ відноситься до Переліку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я та найбільш ефективних і безпечних ліків, необхідних в системі охорони здоров'я.

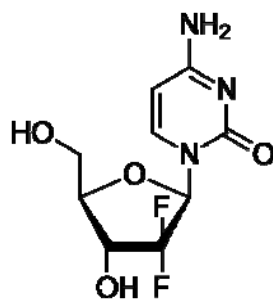


Рис. 1. Структурна формула ГЦ.

Механізм дії препарату полягає в інгібуванні фермента рибонуклеотидредуктази, що призводить до порушення синтезу ДНК, іншим імовірним механізмом дії препарату вважається можливість ГЦ вбудовуватися у структуру ДНК і РНК, внаслідок чого гальмується синтез піримідинових нуклеотидів у S-фазі мітозу. Оскільки мітотична активність більш виражена у клітин, які швидко ростуть, то гемцитабін більш активний до клітин злякисних пухлин, а також клітин крові. Після вбудовування внутрішньоклітинних метаболітів ГЦ в ланцюг ДНК, до її зростаючих ниток додається ще один додатковий

нуклеотид. В результаті настає повне інгібування подальшого синтезу ДНК і запрограмований лізис клітини (апоптоз).

ГЦ швидко розподіляється в організмі після внутрішньовенної ін'єкції, біодоступність препарату становить 100 %. Препарат швидко метаболізується в організмі до своїх активних метаболітів. ГЦ погано зв'язується з білками плазми крові. Проникає через плацентарний бар'єр, даних за проникнення препарату в грудне молоко немає. Метаболізується у печінці з утворенням спочатку активних, пізніше неактивних метаболітів. Виводиться препарат із організму переважно у вигляді метаболітів. Період напіввиведення гемцитабіну з організму становить 42 – 94 хвилин, однак, цей час може збільшуватися при виражених порушеннях функції печінки або нирок.

При застосуванні ГЦ побічні ефекти спостерігаються досить часто, що зумовлено високою токсичністю препарату, особливо висока токсичність спостерігається при одночасному застосуванні ГЦ з іншими хіміотерапевтичними препаратами, зокрема цисплатином або пеметрекседом [3, 4]. Найчастішими побічними ефектами препарату в традиційному клінічному застосуванні є алергічні реакції, порушення роботи серцево-судинної, травної, нервової, дихальної, сечостатевої систем, опорно-рухового апарату та ін. Загальні побічні ефекти включають пригнічення кісткового мозку, проблеми з печінкою і нирками, нудоту, лихоманку, висип, задишку і випадання волосся [5 – 8]. Мають місце також ряд протипоказань [2].

Тому у спеціалізованих наукових і науково-лікувальних центрах багатьох країн проводяться цілеспрямовані дослідження з метою пошуку шляхів подолання вказаних проблем [9 – 15]. Так, наприклад, в одному із підходів, обраних у департаменті гастроентерології, гепатології і ендокринології Hannover Medical School (МНН), Hannover, Germany, планується використання нанокмпозитів (НК), модифікованих хіміо- і імунотерапевтичними лікарськими препаратами та локальних методів терапії.

Загально визнаною альтернативою традиційній хіміотерапії ГЦ є використання методів адресної доставки, що дозволяє створити терапевтичну дозу лікарського препарату у вогнищі захворювання, здійснити терапію при значно меншій його загальній дозі та мінімізувати токсико-алергічні реакції організму пацієнтів [16 – 28]. Серед різноманіття сучасних методів адресної доставки лікарських препаратів та локальної терапії захворювань на рівні органів, клітин та генів, найвищого розвитку на цей час набули методи із застосуванням магніточутливих наноструктур, кон'югованих з протипухлинними засобами різного механізму дії.

Так, в роботах [17, 29 – 40] обґрунтовано концепцію хімічного конструювання магніточутливих НК з багаторівневою ієрархічною наноархітектурою, що характеризуються функціями "наноклінік" [17] та медико-біологічних нанороботів [29 – 40]: розпізнавання мікробіологічних об'єктів у біологічних середовищах; цільової доставки лікарських препаратів до клітин та органів-мішеней і депонування; комплексної локальної хіміо-, імуно-, нейтронзахоплювальної, гіпертермічної, фотодинамічної терапії та магнітно-резонансної томографічної діагностики в режимі реального часу, детоксикації організму шляхом адсорбції рештків клітинного розкладу, вірусних частинок, іонів важких металів тощо та їх видалення за допомогою магнітного поля.

Для виготовлення магніточутливих поліфункціональних НК значний інтерес дослідників викликають наноструктури типу ядро-оболонка на основі однодоменого магнетиту (Fe_3O_4), які характеризуються унікальним комплексом фізичних, хімічних та біологічних властивостей, можливістю створення на їх основі магнітних рідин (МР), що містять онкологічні лікарські засоби різного функціонального призначення та механізмів дії, зокрема цитостатичний препарат цисплатин (ЦП) та антрацикліновий антибіотик доксорубіцин [41 – 44], які застосовуються практично у всіх схемах сучасної онкотерапії.

Синтезовані наноструктури у складі нанокомпозитної МР використані при створенні нового онкологічного лікарського засобу «Фероплат» [45, 46], вперше експериментально обґрунтованого в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, який перебуває на стадії практичного впровадження. Ідея вказаного лікарського засобу полягає в стратегії подолання резистентності злоякісних пухлин до цисплатину шляхом фармакологічної корекції обміну ендогенного заліза, що забезпечується застосуванням залізовмісного НК та цисплатину.

Цитотоксичні властивості МР на основі магнетиту та цисплатину досліджували на чутливих та резистентних до дії цисплатину клітинних лініях раку молочної залози людини (MCF-7 і MCF-7/CP, відповідно) та пухлинах карциноми Герена. Резистентні клітини MCF-7/CP отримано шляхом вирощування вихідних клітин лінії MCF-7 у культуральному середовищі з додаванням наростаючих концентрацій цисплатину в діапазоні доз від 0,01 до 6 мкг/мл. Рівень резистентності на момент проведення досліджень становив 4. Формування резистентності пухлин до цисплатину проводили шляхом послідовних перещеплень пухлинних клітин, які отримували від щурів лінії Wistar з карциномою Герена після проведення курсу терапії цисплатином. Детальніше методики досліджень наведено в [46 – 48].

У системах *in vitro* та *in vivo* доведено переваги застосування нанокомпозитних МР порівняно з використанням цисплатину. Встановлено, що найбільша цитотоксична активність нанокомпозиту, відзначена у резистентній лінії MCF-7/CP, пов'язана з більш активним накопиченням наночастинок феромагнетиту в клітинах за рахунок високого рівня рецепторів трансферину та порушення системи антиоксидантного захисту резистентних клітин. Показано, що магнітна рідина здатна викликати в клітинах резистентної лінії більш виражені цитоморфологічні зміни і генотоксичні ефекти, порівняно з клітинами чутливої лінії. Таким чином встановлено, що МР на основі магнетиту та цисплатину характеризуються здатністю до редокс-регуляції клітин з фенотипом медикаментозної резистентності, що свідчить про перспективу їх використання для патогенетично обґрунтованої таргетної терапії злоякісних новоутворень.

Біологічну безпеку МР у порівнянні з ЦП оцінювали за загальними та біохімічними показниками крові щурів лінії Wistar після завершення курсу терапії. Встановлено, що цисплатин та феромагнітний нанокомпозит призводять до підвищення рівня креатиніну у сироватці крові піддослідних тварин. За іншими біохімічними показниками сироватки крові ці агенти не відрізняються від даних контролю. За загальними показниками крові ці агенти також не відрізняються від контролю.

Зазначимо, що у тварин обох груп (ті, яким вводили цисплатин, і ті, яким вводили МР) було виявлено подібні зміни у структурі печінки та нирок [45, 46]. Показано також, що використання МР за загальними і біохімічними показниками крові не створює більш токсичного впливу на організм, в порівнянні з офіційним протипухлинним препаратом цисплатин.

Отже, фероплат являє собою кон'югат наночастинок магнітної рідини з цисплатином; є стандартизованим засобом для підвищення ефективності хіміотерапії та подолання медикаментозної резистентності злоякісних новоутворень; призначений для доставки цитостатика безпосередньо до пухлинної тканини, що забезпечує максимальне надходження його у клітини і сприяє підвищенню терапевтичного ефекту; здатний до вибіркового накопичення в пухлині і поліпшує протипухлинний ефект цисплатину за підвищення рівня її біологічної безпеки [49 – 51]. Не має аналогів у світі.

Зважаючи на викладене, актуальним з наукової і практичної точок зору завданням є вивчення можливості використання наведених вище підходів для створення нових

ефективних протипухлинних лікарських засобів, зокрема адресної доставки, на основі ГЦ. Вирішення вказаного завдання може розширити функціональні можливості нанокompatитів (НК) для застосування в онкотерапії, покращити їх специфічність, сприяти створенню новітніх багатофункціональних протипухлинних лікарських засобів адресної доставки та локальної терапії, надати нові дані стосовно взаємодії онкологічних препаратів з пухлинними клітинами. Зазначимо, що попередні наші дослідження свідчать про можливість його успішної реалізації. Відомо також, що можливість використання ГЦ у складі магніточутливих НК з метою створення багатофункціональних протипухлинних лікарських засобів адресної доставки та локальної терапії, наприклад, раку молочної залози, гепатоцелюлярної карциноми, остеосаркоми тощо, активно вивчається [52 – 55].

Тому метою цієї роботи є огляд наукових робіт, присвячених синтезу, дослідженням властивостей та застосуванням в медицині, зокрема онкотерапії, нанокompatитів на основі гемцитабіну, перспективних для використання в методі адресної доставки.

Адресна доставка ГЦ за допомогою нанорозмірних носіїв з магнітними властивостями

Магнітні наночастинки (НЧ) застосовуються в протипухлинній терапії в якості контрастуючих агентів при магнітно-резонансній томографії, для магнітної гіпертермії, хіміо-, фотодинамічної та фототермічної терапії [56]. Повідомлялося про застосування НЧ Fe_3O_4 для комбінованої хіміо- та генної терапії. Системи спрямованої доставки лікарських препаратів/генів є ефективними завдяки унікальним магнітним властивостям, вкрай низькій токсичності, відмінній біосумісності, сприятливій деградації в біологічних системах, а також високій реакційній здатності поверхні, що сприяє модифікуванню біосумісними покриттями [57]. Дослідженнями встановлено, що зі збільшенням розміру магнітних наночастинок зростає їх накопичення *in vivo*. Тому чіткий контроль за розмірами і поверхневим покриттям магнітних НЧ може призводити до зменшення їх токсичності і стабілізації магнітних властивостей [56].

Порівняно з іншими магнітними матеріалами, НЧ Fe_3O_4 мають перевагу через можливість перебування в суперпарамагнітному стані. Безгістерезисний характер кривої намагнічування суперпарамагнітних НЧ свідчить про відсутність залишкової намагніченості після вимкнення зовнішнього магнітного поля. Ця властивість сприяє запобіганню агрегації *in vivo*. Після застосування зовнішнього магнітного поля і надвисокочастотного випромінювання поблизу пухлинної тканини НЧ Fe_3O_4 можуть вивільняти лікарські препарати/гени і поглинати енергію мікрохвильового діапазону, швидко перетворюючи її в тепло для гіпертермічної терапії. Температура пухлини зростає, що призводить до зміни структури ліпідів і білків, покращення проникності клітинних мембран, сприяючи входженню лікарських препаратів/генів у пухлинні клітини і підвищенню ефективності хіміо-, гіпертермічної і генної терапії.

Проте, НЧ Fe_3O_4 характеризуються високою поверхневою енергією, що призводить до агрегації навіть за відсутності магнітного поля. Крім того, непокрите НЧ Fe_3O_4 мають високу хімічну активність поверхні і тому значною мірою схильні до окиснення на повітрі, що може обумовлювати значне зниження магнітних властивостей і дисперсності. Тому актуальним завданням залишається удосконалення і розробка методів функціоналізації НЧ Fe_3O_4 різними матеріалами, такими як кремнезем, оксиди металів, полімери, вуглецеві наноструктури, зокрема, що поглинають надвисокочастотне та інфрачервоне випромінювання, активні в люмінесцентних та магнітно-резонансних процесах тощо. Модифікуючі покриття покращують стабільність наночастинок Fe_3O_4 , запобігають агрегації та створюють поверхневі активні центри для координування/кон'югації лікарських препаратів, специфічних лігандів, генів та інших

терапевтичних агентів, що може оптимізувати біомедичне застосування спрямованої доставки лікарських препаратів/генів [57].

Завдяки швидкій ферментативній деградації після внутрішньовенної ін'єкції, ГЦ має короткий період напіввиведення з крові. Це один з головних недоліків використання ГЦ у хіміотерапії. Тому при традиційному використанні необхідно вводити високі дози препарату, щоб досягти необхідної терапевтичної реакції, збільшуючи, таким чином, побічні ефекти.

Для підвищення локальної концентрації ГЦ у пухлині та його цитотоксичної дії, пропонується рішення, що полягає у використанні наночастинок як пасивних або активних носіїв хіміотерапевтичних препаратів [53, 58–60]. Пасивне націлювання базується на використанні ефекту підвищеної проникності і утримання, що пов'язаний з нещільними (пропускаючими) новоутвореними кровоносними судинами та відсутністю лімфатичного відтоку в пухлинній тканині. Активне націлювання здійснюють або за допомогою магнітного наведення, або шляхом застосування різних функціоналізуючих агентів, які специфічно зв'язуються з рецепторами на поверхні цільових ракових клітин.

НЧ Fe_3O_4 , кон'юговані з гемцитабіном, досліджували *in vitro* з метою покращення ефективності ліків [53, 61–63].

У роботі [53] для синтезу магнетиту використано модифікований метод Масарта [64]. Традиційно метод реалізують з використанням двох прекурсорів при мольному співвідношенні $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ 2:1, однак для компенсації окиснення Fe^{2+} [65, 66] та покращення магнітних властивості Fe_3O_4 використано співвідношення між прекурсорами 1,65: 1. Для утворення невеликих міцел як просторур нуклеації наночастинок використано мікроемulsійний метод [67]. Хіміотерапевтичну речовину (ГЦ) вводили в осадкове середовище для сприяння прямій функціоналізації з органічною молекулою під час процесу росту наночастинок. Таким чином здійснено безпосередню функціоналізацію магнетиту хіміотерапевтичною речовиною ГЦ, не використовуючи додаткового лінкера між двома компонентами.

Методами рентгеноструктурного та рентгенофазового аналізу встановлено, що наявність органічної хіміотерапевтичної речовини не впливала на кристалічну структуру наночастинок Fe_3O_4 , не індукувало інших суттєвих змін фазового складу зразків (рис. 2).

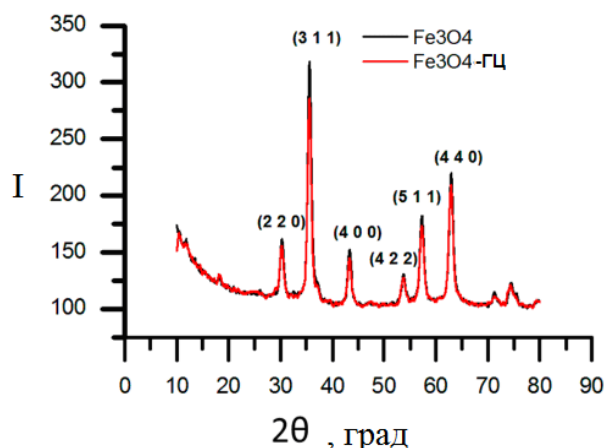


Рис. 2 Дифрактограма Fe_3O_4 і Fe_3O_4 -ГЦ.

Термогравіметричний аналіз використовувався для вимірювання кількості органічної ГЦ-фази, що взаємодіє з неорганічними магнетитними НЧ. Застосовуючи кілька циклів нагрівання як для Fe_3O_4 , так і Fe_3O_4 -ГЦ, з різниці мас була розрахована наявна кількість ГЦ у функціоналізованому зразку (рис. 3).

Перша втрата ваги нижче температури $250\text{ }^\circ\text{C}$ пояснюється випаровуванням поглинутої води на поверхні наночастинок. Деградація органічної хіміотерапевтичної

речовини відбувається у два етапи, між 250–350 і 350–500 °С. Цей додатковий поріг може бути обумовлений деградацією гідроксильних груп на поверхні наночастинок.

За даними скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) поверхня зразків Fe_3O_4 -ГЦ складається з агрегатів сфероїдних наночастинок розмірами від 4 до 20 нм. Метод просвічуючої електронної мікроскопії (ПЕМ) дає більше даних про морфологію та кристалічність як функціоналізованих, так і нефункціоналізованих наночастинок. За допомогою ТЕМ високої роздільної здатності спостерігався високий ступінь кристалічності обох типів зразків, у випадку НК Fe_3O_4 -ГЦ встановлено, що ГЦ індивідуально покриває кожен наночастинок Fe_3O_4 , утворюючи суцільний аморфний шар на їх поверхні, в результаті чого утворюються наноструктури типу ядро-оболонка.

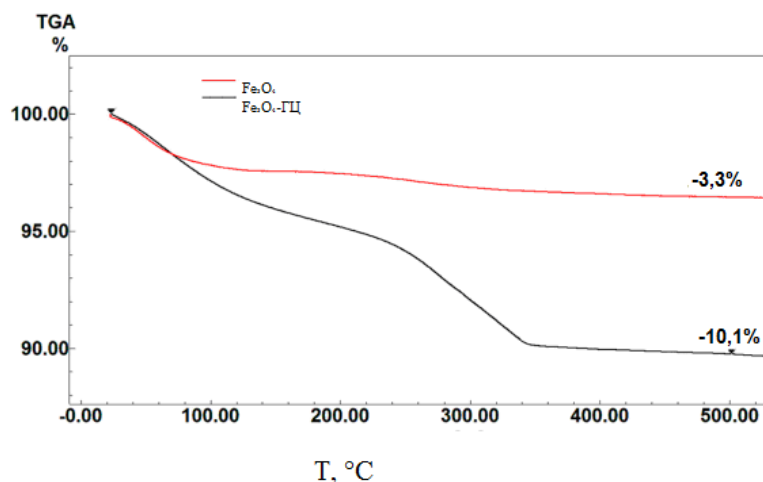


Рис 3. Криві TGA для Fe_3O_4 і Fe_3O_4 -ГЦ; зниження значення маси, показане для зразка Fe_3O_4 становило 3,3 %, тоді як для Fe_3O_4 -ГЦ – 10,1 %.

У [68] досліджено поведінку НЧ, стосовно агрегації та агломерації, при введенні в середовище клітинних культур, збагачене різною кількістю білків, амінокислот, електролітів тощо. Встановлено, що поведінка НЧ *in vitro* та *in vivo* змінюється, при цьому важливим є збереження колоїдної стабільності НЧ після їх взаємодії з різними біологічними середовищами.

У роботі [53] поведінку ГЦ-функціоналізованих НЧ Fe_3O_4 оцінювали у двох поживних середовищах – DMEM та MEM. Інтервал розведень був обраний таким, що відповідає концентраціям в експериментах з оцінки життєздатності при використанні тетразолієвого барвника MTS, що відновлюється клітинними оксидоредуктазними ферментами в нерозчинний формазан, який має пурпурне забарвлення. НЧ Fe_3O_4 -ГЦ, суспендовані в повному MEM, показали значення дзета-потенціалу вище 20 мВ, демонструючи підвищену стабільність порівняно з суспензіями ДМЕМ. Збагачуючись більшою кількістю білків і солей з високою іонною силою у випадку ДМЕМ, може бути певне пригнічення подвійного електростатичного шару [69 – 71], що зменшує сили електростатичного відштовхування, таким чином, дисперсії Fe_3O_4 -ГЦ в середовищі ДМЕМ демонструють нестабільність і осаджуються.

Важливим для терапевтичного використання досліджених кон'югатів є вивчення кінетики вивільнення лікарського засобу в культуральному середовищі. ГЦ-функціоналізовані наночастинок магнетиту вивільняють препарат у середовище протягом перших 24 год (рис. 4). Таке повільне вивільнення потенційно забезпечує більш тривалу присутність лікарського засобу в потоці крові на терапевтичному рівні *in vivo*, є однією з переваг, що надає перспектив їх практичного застосування [53].

Цитотоксичність НЧ магнетиту, а також функціоналізованих Fe_3O_4 -ГЦ НК, тестували на трьох моделях пухлин людини: ВТ 474 (протоковій карциномі молочної

залози людини) (рис. 5), HepG2 (людській гепатоцелюлярній карциномі) (рис. 6) та MG 63 (клітинах остеосаркоми людини) (рис. 7) [53].

Для всіх трьох клітинних ліній вихідий Fe_3O_4 не завдав суттєвих змін життєздатності. НЧ магнетиту виявились біологічно сумісними (життєздатність становила не менше 80 % відповідно до ISO 10993-12: 2001 (E)) [72 – 74].

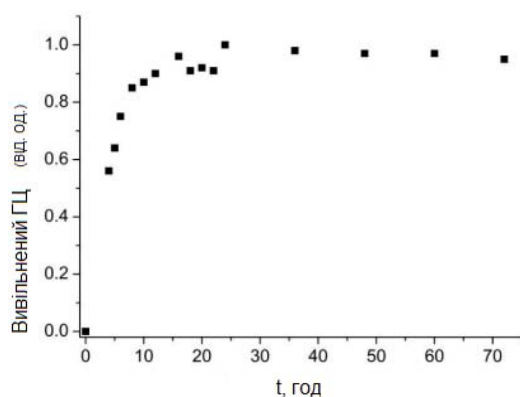


Рис. 4. Кінетика виходу препарату ГЦ з наночастинок Fe_3O_4 -ГЦ у повному середовищі DMEM, при $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , вологість понад 90 %.

У випадку клітинної лінії раку молочної залози BT 474 (рис. 5) результати показали, що вільний ГЦ викликає незначне зниження життєздатності клітин (життєздатність клітин, оброблених ГЦ, перевищує 80 %, порівняно з контролем), починаючи через 24 год після лікування, для найвищої використаної концентрації (0,15 мг / мл). Цитотоксичність ГЦ зростала через 48 та 72 год (життєздатність клітин близько 60 %, порівняно з контролем), незалежно від рівня хіміотерапевтичної дози. Характерно, що триваліший вплив (72 год) не посилював цитотоксичного ефекту ГЦ, порівняно з 48 год експозиції.

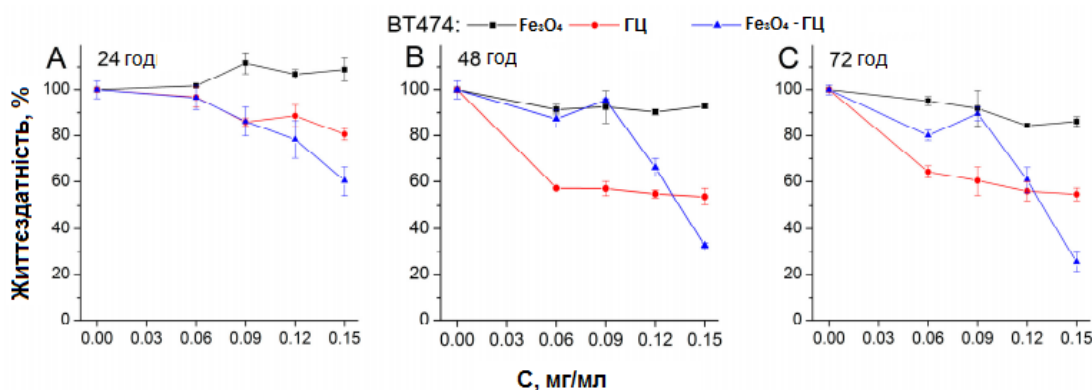


Рис. 5. Життєздатність клітин BT-474 після інкубації з вільним ГЦ і Fe_3O_4 -ГЦ (еквівалент концентрації ГЦ), визначена через: (А) 24 ; (В) 48 і (С) 72 год після лікування.

Наноструктурований кон'югат Fe_3O_4 -ГЦ за найвищої еквівалентної використаної концентрації (0,15 мг/мл) починаючи через 24 год після лікування мав цитотоксичну дію (життєздатність знизилася до 60 %, порівняно з контролем); потім протипухлинний ефект став більш вираженим з часом, через 48 і 72 год після лікування, життєздатність зменшується нижче 80 % для 0,12 мг/мл і нижче 40 % для 0,15 мг/мл.

Активність препарату, як вільного, так і кон'югованого з наночастинками, виявилась залежною від дози та часу. Потенціуючий ефект для нанокон'югата, порівняно з вільним ГЦ, спостерігався за найвищої еквівалентної концентрації гемцитабіну (0,15 мг/мл) на всіх використаних інтервалах часу (рис. 5).

Для клітин HepG2 (рис. 6) через 24 і 48 год лікування, життєздатність незначно знизилася після лікування препаратами чистого ГЦ та Fe_3O_4 -ГЦ на, приблизно 80 %, порівняно з контрольними зразками, без значної залежності від концентрації. Для найвищих еквівалентних концентрацій ГЦ (0,15 мг/мл), ефект застосування нанокон'югату був статистично більш вираженим, ніж той, який демонструє чистий ГЦ.

Цитотоксичний ефект через 72 год після лікування Fe_3O_4 -ГЦ став більш вираженим для всіх тестованих нами концентрацій, ефективність збільшується лінійно з дозою. У цей проміжок часу життєздатність знизилася на 40 %, у випадку Fe_3O_4 -ГЦ, порівняно з чистим препаратом, для найвищої еквівалентної концентрації (рис. 6, С) [53].

Отже встановлено, що ефект Fe_3O_4 -ГЦ більш виражений при більш тривалому вивільненні ГЦ з поверхні НК. Подібний повільніший вихід ГЦ виявлено для НЧ магнетиту з покриттям хітозан-ГЦ [52]. Відомо, що для вільного ГЦ проникання в клітини здійснюється за участю білків-переносників нуклеозидів, у той час як неорганічні наночастинки можуть бути або захоплені шляхом ендоцитозу, або безпосередньо дифундувати в клітини [75].

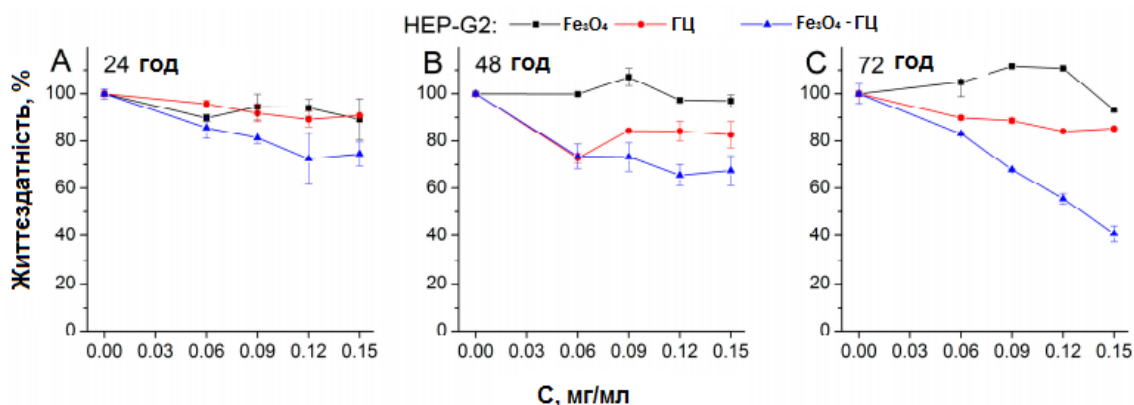


Рис. 6. Життєздатність клітин HepG2 після інкубації з вільним ГЦ і Fe_3O_4 -ГЦ (еквівалент концентрації ГЦ), визначена через (А) 24; (В) 48 і (С) 72 год після лікування.

Третя клітинна лінія, остеосаркома MG-63, протестувана в роботі [53], характеризується наявністю щілинних контактів (білкових каналів, які дозволяють проходження іонів та невеликих молекул між сусідніми клітинами). Чистий ГЦ виявився високоцитотоксичним для цих клітин, починаючи з низьких концентрацій (рис. 7). Цитотоксична активність чистого ГЦ, як було показано, є більш помітною, ніж ефект, викликаний нанокон'югатом. Однак ефекти наносистеми також виявилися сильно цитотоксичними для найвищої використаної еквівалентної концентрації ГЦ (0,12 мг/мл), що призводить до життєздатності менше 40 % після 72 год лікування. Захоплення аналогу нуклеозидів відбувається набагато швидше, порівняно з функціоналізованим магнетитом, що призводить до підвищення загибелі клітин.

Висока чутливість до гемцитабіну (життєздатність знизилася на 50 %, порівняно з контролем) спостерігалась і в інших клітинних лініях, що мають щілинні контакти, а саме – гліобластомі U87 та SKI-1, остеосаркомі MNNG/HOS [76]. Підвищена ефективність лікування в цих випадках визначається тим, що механізм проникнення ГЦ здійснюється через щілинні контакти.

Дослідження біорозподілу наночастинок Fe_3O_4 -ГЦ, які вводили в черевну порожнину мишам-альбіносам, показали відсутність очевидного накопичення наночастинок в таких органах як мозок, печінка, серце (міокард), легені чи підшлункова залоза через 7 і 14 днів після ін'єкції. Натомість, присутність наночастинок спостерігалась на рівні селезінки у вигляді добре окреслених агрегатів через ті самі часові інтервали.

Через 7 днів після введення наночастинки були видимими в червоній пульпі за їх відсутності в білій пульпі, яка виглядала гіпертрофованою; це явище пов'язане з тим, що наявність наночастинок у кровоносній системі стимулює макрофаги. На рівні червоної пульпи наночастинки спостерігалися всередині клітин макрофагів, в кордонах Білрота, але також всередині синусних капілярів. Наночастинки Fe_3O_4 виглядали як агреговані темно-коричневі сферичні гранулярні структури різних розмірів (діаметром до 13 мкм). Через 14 днів після ін'єкції більш висока щільність агрегатів магнетиту виявлялася в червоній пульпі [53].

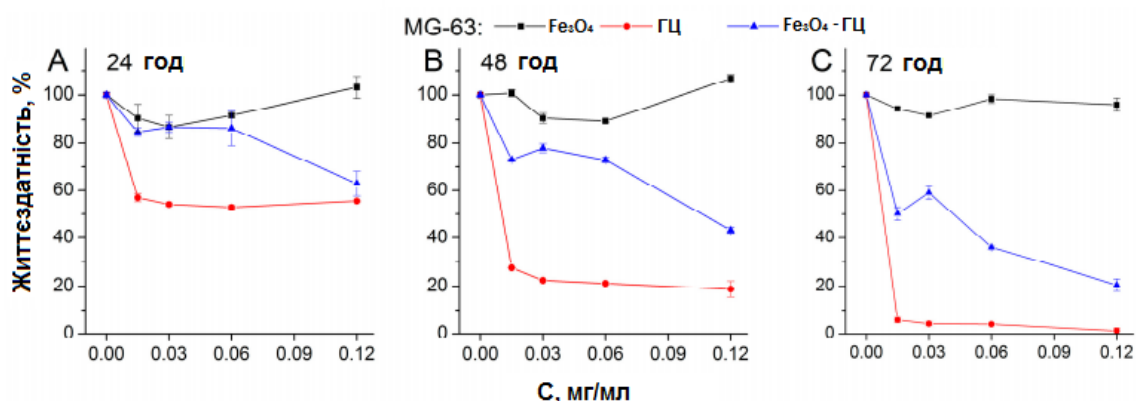


Рис. 7. Життєздатність клітин MG-63 після інкубації з вільним ГЦ та НК Fe_3O_4 -ГЦ (еквівалент концентрації ГЦ), визначена через (А) 24; (В) 48 і (С) 72 год.

З метою збільшення періоду напіввиведення ГЦ у системному кровообігу, автори [61] дослідили зразки наночастинок магнетиту, покритих послідовними шарами полі(акрилової) кислоти та хітозану.

У роботі [52] описано відтворювану методику для приготування НК типу ядро/оболонка, що складаються з магнітного Fe_3O_4 -ядра та оболонки з хітозану, завантажених протипухлинним препаратом ГЦ.

Залежність дзета-потенціалу НЧ Fe_3O_4 (■), хітозану (●) та НК Fe_3O_4 /хітозан (○) від рН в присутності 10^{-3} М KNO_3 наведено на рис. 8. Зважаючи на дуже різні значення ζ ядер Fe_3O_4 порівняно з частинками хітозану, електрокінетичні вимірювання були успішно використані для якісної перевірки ефективності покриття хітозану навколо частинок оксиду заліза [52].

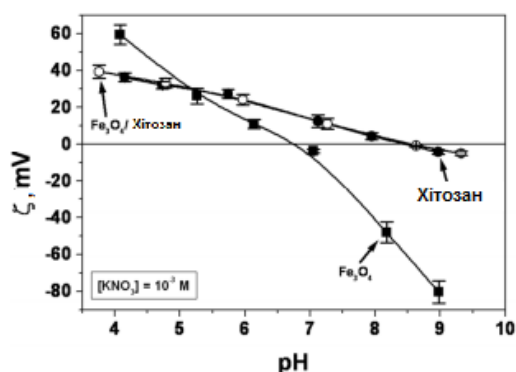


Рис. 8. Залежність дзета-потенціалу НЧ Fe_3O_4 (■), хітозану (●) та НК Fe_3O_4 /хітозан (○) від рН в присутності 10^{-3} М KNO_3 .

На рис. 9 наведено результати досліджень магнітного гістерезису НК Fe_3O_4 /хітозан (а) та нагрівання (б) магнітної рідини Fe_3O_4 /хітозан (10 мг.мл^{-1}) високочастотним електромагнітним полем (250 кГц , 4 кА м^{-1}). Реакцію НК ядро/оболонка (позначено стрілкою) у складі МР на зовнішнє магнітне поле ($1,1 \text{ Т}$) досліджували за допомогою оптичної мікроскопії (збільшення 63х, вставка на рис. 9, а).

Як видно з рисунка, температура піднялася з кімнатної до 41 °С протягом приблизно 15 хв. В експериментальних умовах максимальна температура 45 °С досягнута через 30 хв і стабілізована до кінця експерименту. Це продемонструвало контроль над температурним і тепловим потоком, що є основною вимогою для застосування гіпертермії.

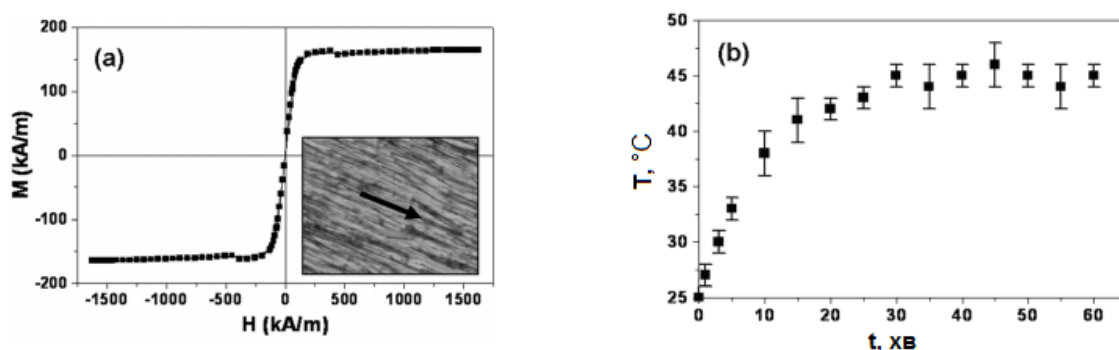


Рис. 9. Криві: (а) – магнітного гістерезису НК Fe_3O_4 /хітозан (вставка: орієнтування НК у МР магнітним полем); (б) – нагрівання магнітної рідини у високочастотному електромагнітному полі.

Встановлено [52], що ефективність адсорбційної іммобілізації ГЦ на поверхні хітозану в НК зростає від $1,9 \pm 0,3$ до $8,1 \pm 1,3$ % для концентрацій препарату в розчині, що змінюються від 10^{-4} до 10^{-2} М. При цьому максимальне завантаження НК ГЦ було низьким (1.351 ± 0.172 %), що можна пояснити несприятливою взаємодією між позитивно зарядженою оболонкою хітозану і позитивно зарядженою молекулою ГЦ в розчині, імовірно через протонацію групи $-\text{NH}_2$.

З метою збільшення концентрації ГЦ досліджено вплив кількості поверхнево активної речовини (ПАР) Pluronic F68 та хітозану на розмір частинок та ефективність захоплення гемцитабіну у хітозан в процесі синтезу НК. Показано, що розмір і форма НК Fe_3O_4 /хітозан типу магнітне ядро/оболонка, а також характеристики отриманих суспензій суттєво не змінювалися при завантаженні гемцитабіну в полімерну матрицю в присутності ПАР. Крім того, не було осадження препарату, ані агрегації НК, помітна зміна розміру нанокompatитів не була виявлена методом динамічного розсіювання світла навіть через 2 тижні зберігання при $4,0 \pm 0,5$ °С у воді. В результаті, використання ПАР дозволило збільшити захоплення ГЦ полімерною матрицею хітозану до 44,6 %, а максимальне завантаження НК ГЦ до 13,4 %.

Результати досліджень процесів вивільнення лікарського препарату НК Fe_3O_4 /хітозан у фосфатному буфері та фізіологічному розчині наведено на рис. 10.

При рН 7,4 вивільнення гемцитабіну, адсорбованого на поверхні НК Fe_3O_4 /хітозан було завершено протягом 3 год, внаслідок швидкої десорбції (рис. 10, а). На відміну від цього, в НК, виготовлених з використанням захоплення ГЦ, спостерігається вивільнення препарату внаслідок двохетапного процесу, що є типовим для полімерної оболонки, з початковим, швидким вивільненням (сплеском, до 35 % за 3 год), та вивільнення решти стійким способом протягом 117 годин (5 діб). Сплеск вивільнення приписували витоку поверхнево-асоційованого та/або погано захопленого препарату. Вивільнена фаза на другому етапі, ймовірно, відповідала фракції лікарського засобу (65 %), що була глибоко вбудована в хітозанову наноматрицю і відповідала більшій довжині шляху дифузії до витоку. Це свідчить про те, що основна частка гемцитабіну була захоплена в полімерний компонент НК, а не адсорбувалась на його поверхні.

Коли рН середовища знижувався до 5, криві вивільнення гемцитабіну (рис. 10, б) були подібними до отриманих при рН 7,4 (рис. 10, а), за винятком того, що процеси

відбуваються набагато швидше: 70 % вмісту ліків НК було випущено протягом 3 год, тоді як захоплений препарат був повільно вивільнений протягом наступних 45 год. Цьому швидшому вивільненню при рН 5 приписували більш високу розчинність хітозану при більш низькому значенні рН, що сприяло швидшому витоку гемцитабіну і, як наслідок, частковій солюбілізації матриці.

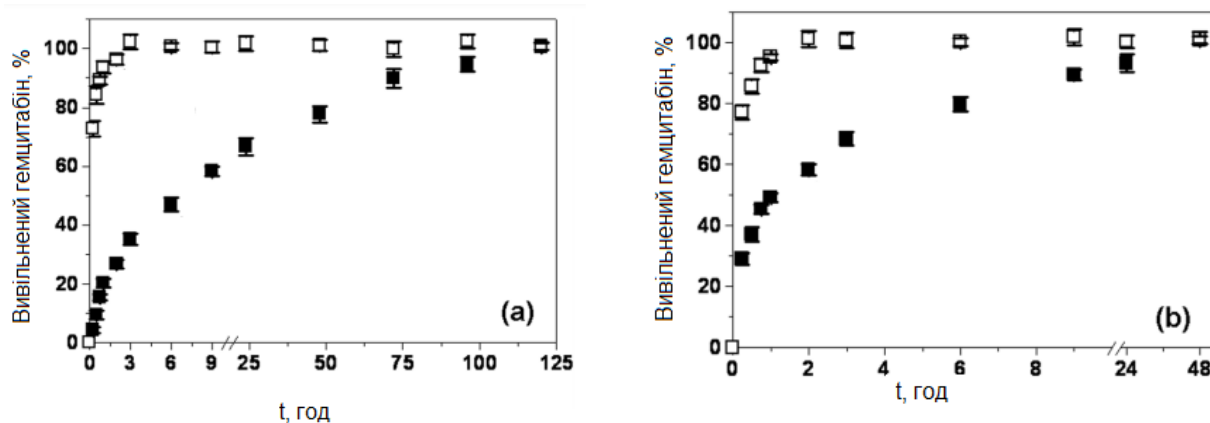


Рис. 10. Залежності вивільнення гемцитабіну (%), адсорбованого (відкриті символи: □) та захопленого (повні символи: ■) з нанокompatивів Fe₃O₄/хітозан від часу в (а) фосфатному буфері PBS (рН = 7,4±0,1) та (б) розчині НСІ (рН = 5,0±0,1) при 37,0±0,5 °С

Отже, за результатами досліджень [52] НК Fe₃O₄/хітозан можуть забезпечити ефективне вивільнення захопленого гемцитабіну *in vivo*, і, таким чином, можуть бути перспективними для магнітокерованої адресної доставки більш високих концентрацій препаратів внутрішньоклітинно (наприклад, у кислому середовищі лізосом після поглинання клітиною) та/або в кисле середовище пухлинних інтерстицій.

Біологічна оцінка кон'югатів *in vitro* показала багатообіцяючі результати стосовно їх цитотоксичності щодо ракових клітин людини, в той час як тест біорозподілу *in vivo* показав їх біосумісність з нормальними живими тканинами. Однак для того, щоб мати більше точності в введенні та досягненні тканини пухлини, може бути використаний активний націлюючий агент.

Вивчення процесів вивільнення іммобілізованого лікарського засобу ГЦ з магніточутливих НК, а також магнітної гіпертермії з їх використанням, здійснено авторами [54]. Як основу для синтезу НК взято комерційні магнітні частинки типу ядро-оболонка (MagP®-ОН), що складаються (рис. 11) з магнетитного ядра та полімерної оболонки з кополімерів з 54 мас.% метилметакрилату (PMMA), 31 мас.% етиленгліколю диметакрилату (PEGDMA) та 15 мас.%, гідроксилетилметакрилату або полі (PHEMA).

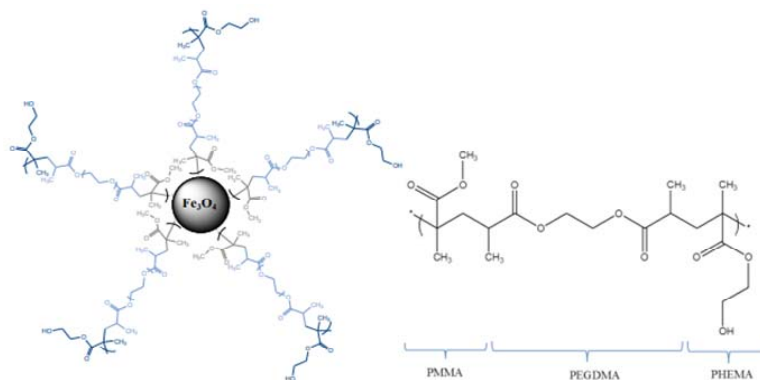


Рис. 11. Хімічна структура MagP®-ОН магнітних наночастинок.

Кінцеві мономерні являють собою: ММА (пов'язані з магнітними частинками за допомогою емульсійної полімеризації) та НЕМА (забезпечують наявність ОН груп на поверхні НК). Полімер EGDMA діє як зшиваючий агент, визначає товщину шару і додає частинкам біологічної сумісності, оскільки ПЕГ визнаний одним з найкращих варіантів для уникнення опсонізації та подальшої атаки на частинки клітинами мононуклеарного фагоцита імунної системи [77].

ГЦ було асоційовано з частинками MagP-COOH шляхом диспергування їх у водному розчині препарату. Різні кількості MagP-COOH були дисперговані в 1 мл водного 1 мМ розчину ГЦ при механічному перемішуванні при кімнатній температурі протягом 18 год. Потім, частинки з адсорбованим ГЦ центрифугували при 14000×об/хв протягом 30 хв для видалення супернатанту. Потім застосовували багаторазове промивання частинок водою Milli-Q. На завершення частинки, покриті ГЦ, ліофілізували для отримання готових магнітних векторів.

Вивільнення лікарського засобу з завантажених частинок досліджували методом спектрофотометрії наступним чином: 20 мг частинок було дисперговано в 5 мл PBS (рН 7,4); через певні проміжки часу частинки декантували застосовуючи постійний магніт, потім 0,5 мл супернатанту видаляли і замінили тим самим об'ємом чистого PBS. Вилучену аліквоту потім центрифугували при 14000×об/хв протягом 30 хв при кімнатній температурі, вимірювали абсорбцію супернатанту, кількість ГЦ обчислювали застосовуючи калібрувальний графік.

Після видалення ПАР частинки MagP®-ОН досліджували методом TEM. За даними рис. 12, їх можна описати як полімерну оболонку, що інкапсулює ядра магнетиту.

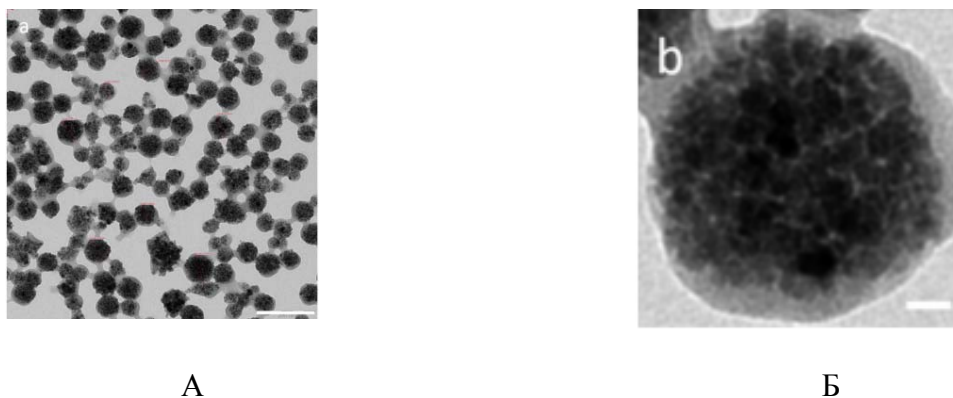


Рис. 12. (А) TEM-зображення інкапсульованих частинок MagP®-ОН. Шкала масштабу: 200 нм. (Б) Деталізація однієї частинки. Шкала масштабу – 20 нм.

Гістограма розподілу розміру частинок, отримана з аналізу зображень TEM (рис. 13, а), визначає середній ($\pm D_s$) діаметр частинок, рівний 76 ± 13 нм. Гідродинамічний діаметр D_h цих частинок при їх диспергуванні у воді вимірювали методом лазерної кореляційної спектроскопії (DLS), отриманий розподіл розмірів показано на рис. 13, б; за цими даними $D_h = 86 \pm 11$ нм.

Як відомо, зазвичай значення гідродинамічного діаметра дещо перевищують отримані з TEM за рахунок гідратації найвищого гідрофільного шару полімеру та можливості певної агрегації частинок у водному середовищі.

Комерційні НЧ MagP®-ОН демонстрували негативний дзета-потенціал $-27,7 \pm 0,5$ мВ до промивання для видалення ПАР. Після такого видалення вимірювали дзета-потенціал при різних рН для визначення поверхневого заряду частинок без впливу ПАР. Як показано на рис. 14, ізоелектрична точка MagP®-ОН відповідає рН 6,9. Це дозволяє вибрати оптимальне значення рН для проведення електростатичного приєднання лікарського засобу, оскільки ГЦ-гідрохлорид є позитивно зарядженим і стабільним при

будь-якому значенні рН між відповідним pK_a ($= 3,6$) ГЦ та рН 10, вище якого препарат зазнає деградації [78 – 82]. Тому подальші експерименти з завантаженням та вивільненням лікарського засобу проводили при фізіологічному рН, завдяки чому магнетит був негативно заряджений, а ГЦ – позитивно.

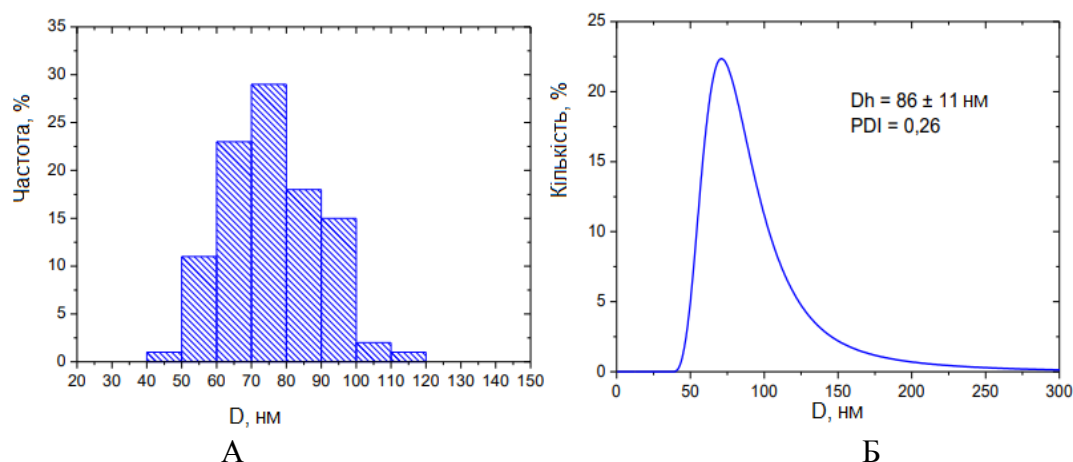


Рис. 13. Гістограми частинок MagP®-OH: за даними TEM (А) та DLS (Б).

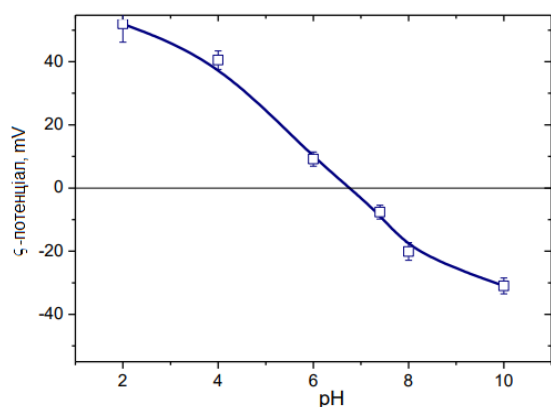


Рис. 14. Дзета-потенціал MagP®-OH.

На рис. 15 показано розподіл зета-потенціалу комерційних НЧ (MagP®-OH) до і після карбоксилювання частинок (MagP®-COOH). Видно, що середнє значення дзета-потенціалу при фізіологічному рН стає більш негативним (від $-7,6 \pm 0,2$ мВ до $-17,5 \pm 0,3$ мВ) після карбоксилювання, і це може сприяти більш високому приєднанні ГЦ. Це підтверджено експериментально, адже дзета-потенціал стає менш негативним ($-12,4 \pm 0,3$) мВ після контакту частинок MagP®-COOH (23 мг) з 1 мл водного розчину 1 мМ ГЦ при механічному перемішуванні протягом 18 год.

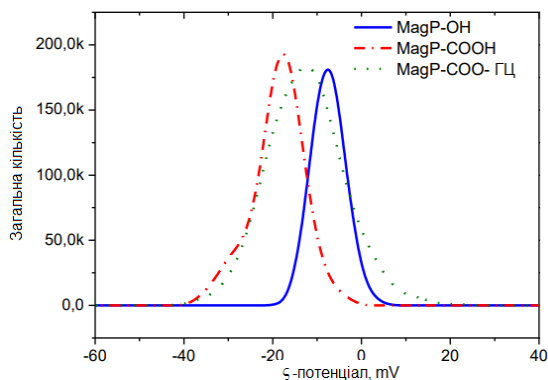


Рис. 15. Розподіл дзета-потенціалу MagP®-OH, MagP®-COOH та системи MagP®-COOH/ГЦ.

Залежність намагніченості НЧ MagP®–ОН від магнітного поля представлена на рис. 16. Суперпарамагнітна поведінка НЧ магнетиту проявляється в наноструктурі, хоча наявність немагнітної полімерної оболонки зменшує намагніченість насичення, порівняно з магнетитом ($90 \text{ Гс}\cdot\text{см}^3/\text{г}$) до значення, близького $35 \text{ Гс}\cdot\text{см}^3/\text{г}$.

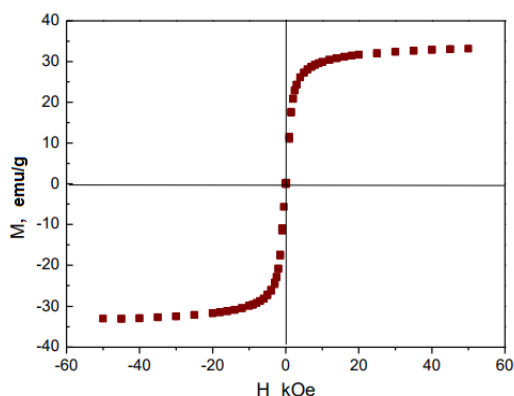


Рис. 16. Крива намагніченості магнітних наночастинок MagP®–ОН.

На рис. 17, а показано залежність температури від часу суспензії наночастинок MagP®–ОН перед завантаженням ГЦ, для різних частот поля (285, 236, 206 та 185 кГц). Можна бачити, що час, необхідний для досягнення 41°C , зменшується з частотою.

Таким чином, для найвищої частоти виявляється швидке підвищення температури від 37 до 41°C за час менше хвилини, що ідеально підходить для терапії раку. Значення SAR досягають практично необхідних значень, причому, вони збільшувались із частотою поля. Навпаки, потужність внутрішніх втрат, як показано в [54], не залежить від частоти. Аналіз цих результатів дозволяє зробити висновок, що частинки MagP®–ОН є корисним інструментом для локального нагрівання та генерування достатньої кількості тепла для локального підвищення температури пухлинної тканини та ефективного лікування методом гіпертермії.

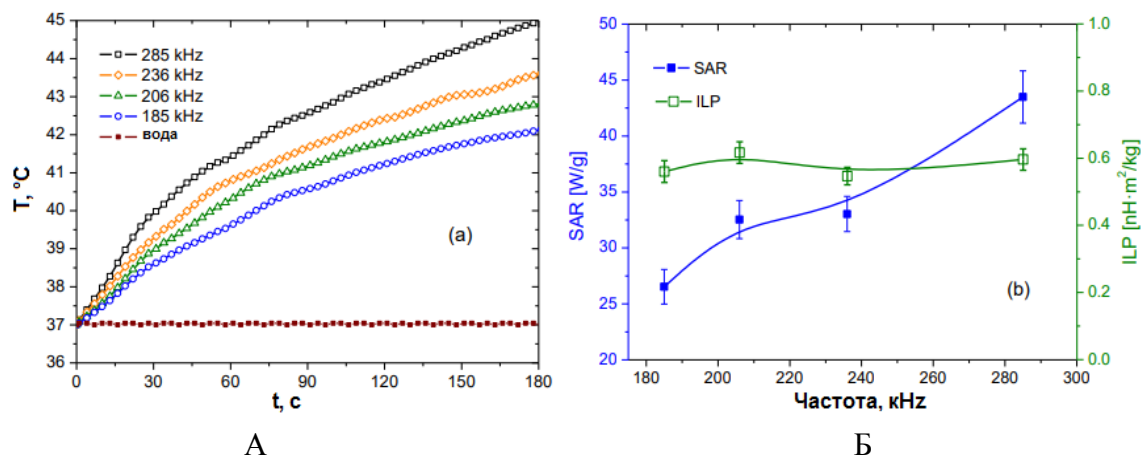


Рис. 17. (А) Зміна температури в часі для різних частот при гіпертермічних експериментах, проведених з суспензіями, що містять 10 мг/мл MagP®–ОН. (Б) Оцінка поглинутої питомої потужності (SAR) та внутрішніх магнітних втрат (ILP). Амплітуда поля становила $H_0 = 16,2 \text{ кА/м}$ у всіх експериментах.

Дослідження вивільнення ГЦ проводили в буфері PBS при рН 7,4, що імітує фізіологічний умови. Вивільнення лікарського засобу тестували при контрольованих температурах 37 ± 1 та $43\pm 1^\circ\text{C}$. Третій тест на вивільнення проводили за допомогою магнітного поля змінного струму, яке застосовують при гіпертермії, щоб оцінити потенційну запускаючу дію поля на вивільнення лікарського засобу.

Результати типового експерименту з гіпертермією та вивільненням лікарських засобів показаний на рис. 18, а. Наночастинки, завантажені препаратом, піддавали впливу магнітного поля протягом 30 хв. Після швидкого збільшення температури система була стабілізована між 43 °С і 44 °С за допомогою ручного керування напруженістю магнітного поля.

Результати вивільнення лікарських засобів наведені на рисунку 18, б. Встановлено, що найшвидше вивільнення ГЦ відбувалось при застосуванні магнітного поля, що забезпечує гіпертермічну дію на рівні 43 °С та повне вивільнення протягом 4 годин.

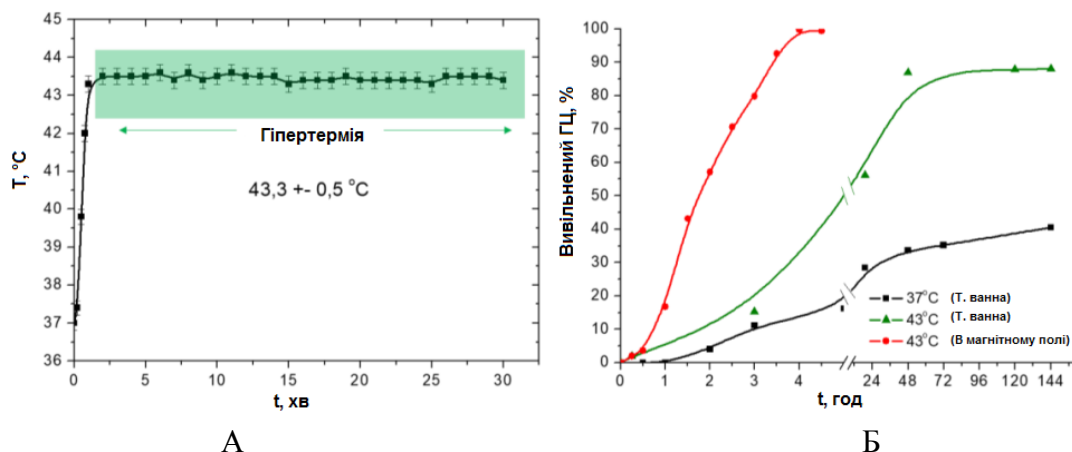


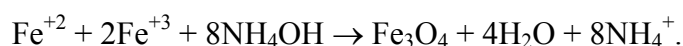
Рис. 18. (А) Типовий експеримент з гіпертермією та вивільненням лікарського засобу; (б) вивільнення ГЦ в термостатованій ванні при 37, 43 °С та за гіпертермічної дії магнітного поля на рівні 43 °С.

Для покращання селективності і накопичення препарату в пухлинній тканині наночастинки часто кон'югують зі специфічними біомолекулами чи лігандами, такими як моноклональні антитіла чи інші білки (наприклад, трансферин), нуклеїнові кислоти (аптамери), малі молекули (фолієва кислота), полімери (гіалуронова кислота). Ці молекули мають специфічну спорідненість до рецепторів, які експресуються та в надлишку знаходяться на пухлинних клітинах, але в обмеженій кількості – на нормальних, що покращує ефективність накопичення препаратів у пухлинних ділянках і призводить до зменшення небажаних побічних ефектів [83].

Так, повідомляється про розробку наночастинок оксиду заліза, кон'югованих з гемцитабіном, для лікування гліобластоми (пухлини мозку). Хлоротоксин – пептид, здатний проникати через гематоенцефалічний бар'єр, прикріплювали до наночастинок після їх кон'югації з ГЦ. Наночастинки мали дрібний розмір (~ 32 нм), однорідний розподіл за розмірами та зберігали стабільність у біологічному середовищі. Наночастинки ефективно проникали в пухлинні клітини і без втрати активності, порівняно з вільним ГЦ, мали пролонгований час напіврозпаду у кровоносній системі і здатність проникати через гематоенцефалічний бар'єр на моделі мишей дикого типу [84].

В Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України синтезовано нові наноконізпозити і магнітні рідини на основі магнетиту, гемцитабіну та антитіла HER2, досліджено їх властивості та біоактивність по відношенню до клітин гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) печінки людини лінії HepG2 [85 – 87].

Синтез нанодисперсного магнетиту здійснено за методикою [31] співосадженням солей заліза за реакцією:



Синтезовані ансамблі НЧ Fe_3O_4 характеризувались розмірами 3 – 23 нм. Середній розмір НЧ (d_0) залежав від умов синтезу і становив 6–13 нм, розподілом за розмірами можна було керувати технологічно. Питома поверхня (S_n) синтезованого магнетиту, залежно від середнього розміру частинок, становила $S_n = 90\text{--}180 \text{ м}^2/\text{г}$, в роботі використовували зразки, для яких $S_n = 110 \pm 1 \text{ \% м}^2/\text{г}$, значення середнього діаметра НЧ Fe_3O_4 , розрахованого за результатами досліджень рентгенівських дифрактограм по формулі Шеррера D_{XRD} , становило 10.5 нм. Вивченням ІЧ-спектрів поверхні магнетиту виявлено функціональні групи ОН, концентрація яких становила 2,4 ммоль/г [31, 34].

Синтезований магнетит характеризується задовільними магнітними характеристиками: коерцитивна сила $H_c = 55,0 \pm 2,5 \text{ \% E}$, питома намагніченість насичення $\sigma_s = 56,2 \pm 2,5 \text{ \% Гс}\cdot\text{см}^3/\text{г}$, відносна залишкова намагніченість $M_r/M_s = 0,2 \pm 2,5 \text{ \%}$. Такі характеристики є важливими для медико-біологічних застосувань [31, 88], наприклад, при направленому транспорті лікарських препаратів по кровоносних судинах малого діаметру, в яких вкрай небажаними є емболізація та агрегація частинок.

У роботах [34, 37] встановлено, що синтезований магнетит з наведеними властивостями характеризується суперпарамагнетизмом наночастинок і знаходиться в абсолютно однодомному стані. Як відомо, суперпарамагнетизм є формою магнетизму, що виявляється у феро- і феримагнітних частинках. Якщо такі частинки мають досить малі розміри, то вони переходять в однодомний стан, тобто стають однорідно намагніченими по всьому об'єму при будь-яких значеннях і напрямках поля H . До особливостей однодомного стану вказаних частинок також можна віднести існування доменів не тільки в сплавах і сполуках у твердому стані, а й в рідких середовищах (суспензіях і колоїдах).

Адсорбцію ГЦ на поверхні магнетиту Fe_3O_4 проводили у середовищі фізіологічного розчину в діапазоні концентрацій $C_0 = 0,02\text{--}0,67 \text{ мг/мл}$ ($g = 0,03 \text{ г}$, $V = 5 \text{ мл}$, $\text{pH} = 3,0$) протягом 2 год в динамічному режимі при кімнатній температурі. Рівень pH середовища розчину ГЦ на 0,9 % NaCl задано 0,1 н HCl . Кількість адсорбованої речовини на поверхні магнетиту визначали за допомогою спектрофотометра по калібрувальному графіку. Калібрувальний графік будували за УФ- спектрофотометричними даними.

Для кількісного опису рівноважних процесів в дослідженому діапазоні концентрацій були використані моделі Ленгмюра, Фрейндліха, БЕГ [89]. Для визначення величин констант, що входять в рівняння ізотерм використані лінеаризовані рівняння даних моделей.

У експериментах спостерігалось відхилення характеру адсорбції від схеми Ленгмюра, що може бути зумовлене наявністю декількох типів центрів зв'язування, які характеризуються різними значеннями констант рівноваги (енергетична неоднорідність) та/або ефектів сумісної адсорбції. Найвище значення коефіцієнту кореляції $R^2 = 0,996$ для ізотерми Фрейндліха вказує на можливість застосування даної моделі для опису адсорбції на поверхні Fe_3O_4 , а кореляція розрахункових та практично отриманих величин адсорбційної ємності це підтверджує.

Експериментальні значення адсорбційної ємності A становили $\sim 37,2 \text{ мг/г}$, ступінь вилучення $R (\text{\%}) = 33,13 \text{ \%}$, коефіцієнт розділення $E = 82,58 \text{ ml/g}$.

Результати наведених досліджень свідчать, що нанорозмірний магнетит може бути перспективними для виготовлення магніточутливих адсорбційних матеріалів медичного призначення, наприклад, для детоксикації організму після терапії ГЦ.

Досліджено магнітні властивості нанокомпозитів $\text{Fe}_3\text{O}_4@ГЦ$. Виміряні петлі гістерезису НЧ магнетиту, та НК з імобілізованим ГЦ, наведені на рис. 19 (σ – питома намагніченість, H – напруженість магнітного поля), в табл. 1 наведено магнітні характеристики магнетиту та НК з адсорбованим гемцитабіном, отриманих з експериментальних петель гістерезису.

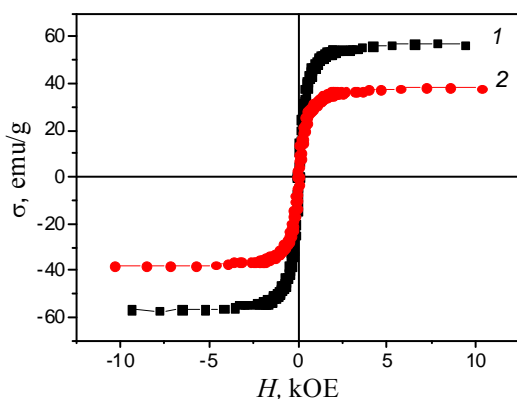


Рис. 19. Петлі гістерезису: 1 – магнетиту, 2 – композиту Fe₃O₄@ГЦ; T = 300 К.

Таблиця. Магнітні характеристики магнетиту та НК з адсорбованим ГЦ

Зразок	H_c , Oe	σ_s , emu/g	σ_r , emu/g	σ_r/σ_s	$\alpha_{Fe_3O_4}^{calc}$, %
Fe ₃ O ₄	41	57,7	10,4	0,18	100
Fe ₃ O ₄ @ГЦ	44	39,0	6,07	0,15	68

В таблиці: H_c , Oe – коерцитивна сила; σ_s , emu/g – питома намагніченість насичення НК; σ_r , emu/g – залишкова питома намагніченість НК; σ_r/σ_s – відносна залишкова намагніченість; $\alpha_{Fe_3O_4}^{calc}$ – розрахована масова концентрація Fe₃O₄ у НК, %.

Використовуючи метод магнітної гранулометрії та припускаючи, що товщина шарів ГЦ мало залежить від діаметру НЧ Fe₃O₄, побудовано (рис. 20) гістограми відносних частот діаметрів НЧ Fe₃O₄ d і НК Fe₃O₄@ГЦ D (1, 2 відповідно).

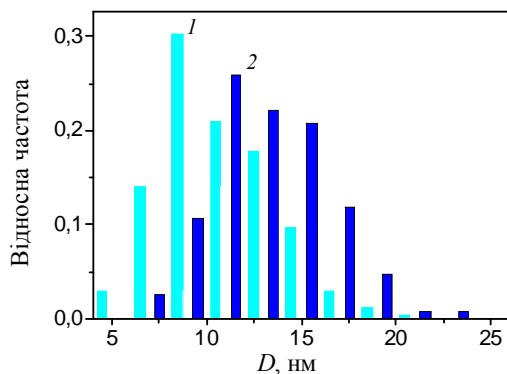


Рис. 20. Гістограми відносних частот діаметрів НЧ Fe₃O₄ і НК Fe₃O₄@ГЦ, (1, 2 відповідно).

Отримані результати є характерними для структур типу ядро-оболонка. Методом магнітної гранулометрії оцінено середнє значення товщини адсорбованого шару ГЦ у складі НК Fe₃O₄@ГЦ, яке становить 2,4±0,1 нм.

Синтезовано магнітні рідини (МР) на основі магнетиту і фізіологічного розчину (ФР), стабілізовані олеатом натрію (OlNa) і поліетиленгліколем (PEG), що містять ГЦ (Fe₃O₄@ГЦ/OlNa/PEG+ФР).

У якості дисперсійного середовища зразків магнітних рідин для досліджень використовували ФР. Зазначимо, що використання у якості дисперсійного середовища дистильованої води істотно магнітні властивості колоїдних систем не змінювало.

Як дисперсну фазу використовували нанорозмірний магнетит в однодомному стані в концентрації 14 мг/мл (для порівняння), або НК Fe₃O₄@ГЦ на його основі.

Для запобігання агрегації наночастинки Fe_3O_4 і НК стабілізували олеатом натрію ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-\text{O}-\text{Na}$), динамічний режим, 1 год) і поліетиленгліколем (ПЕГ-2000).

Масу олеату натрію $m_{\text{OI.Na}}$ для стабілізації поверхні НЧ і НК у складі МР розраховували з врахуванням концентрації гідроксильних груп на поверхні магнетиту. Розрахунок проводили за формулою: $m_{\text{OI.Na}} = B \cdot M \cdot m$, де B – концентрація гідроксильних груп (2,2 ммоль/г на поверхні вихідного нанорозмірного магнетиту, M – молекулярна маса олеату натрію (304 г/моль), m – маса Fe_3O_4 або НК.

Відомо, що ПЕГ перешкоджає адсорбційним взаємодіям компонентів рідини з молекулами білків [89], що є важливим при медичних застосуваннях магнітних рідин. Додаткове модифікування ПЕГ-2000 здійснювали в динамічному режимі з використанням шейкера, кількість полімеру складала 10–15 % від маси наважки НЧ Fe_3O_4 , або НК [34, 37].

На рис. 21 наведено петлі гістерезису водних МР $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{OI.Na}/\text{PEG}+\text{ФР}$ (товщина шару стабілізатора ~ 3 нм) (1) і $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{ГЦ}/\text{OI.Na}/\text{PEG}+\text{ФР}$ (2). Товщина шару ГЦ $\sim 2,3$ нм, стабілізатора ~ 3 нм, об'єми води в МР однакові.

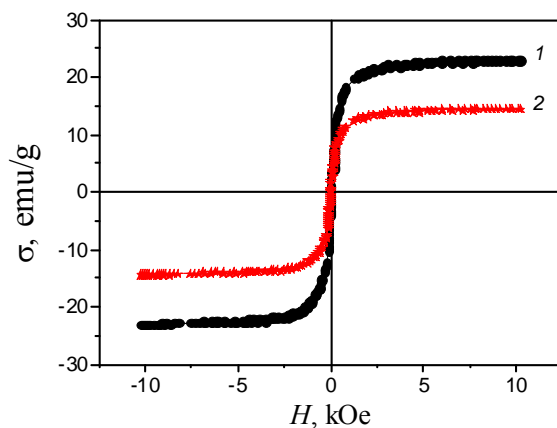


Рис. 21. Петлі гістерезису водних МР $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{OI.Na}/\text{PEG}+\text{ФР}$ (товщина шару стабілізатора ~ 3 нм) (1) і $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{ГЦ}/\text{OI.Na}/\text{PEG}+\text{ФР}$ (2).

Як відомо, з урахуванням розподілу нанокompatитних частинок за об'ємами $p(V)$ криву намагнічення МР (рис. 5) можна представити у вигляді [90]:

$$M(H) = \varphi_p \int_0^{\infty} p(v) v^{-1} [M_s v_c L(x) + \chi v_s H] dv, \quad (1)$$

де φ_p – об'ємна доля магнетика в МР, визначена за її густиною,

$p(v) = \frac{1}{v \sigma_{\ln v} \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\ln^2(v/v_m)/(2\sigma_{\ln v}^2)\right]$, v – об'єм НК частинки, M_s – намагніченість

насичення ядра, v_c – об'єм ядра, $L(x) = \text{cth}x - x^{-1}$ – функція Ланжевена, $x = \left(\frac{M_s v_c H}{k_B T}\right)$, χ –

магнітна сприйнятливості оболонки, v_s – об'єм оболонки. Основний вклад в намагніченість МР вносить суперпарамагнетизм ядер і парамагнетизм оболонок частинок. У порівнянні з суперпарамагнетизмом ядер у полях $H = 0-10$ кОе у більшості випадків парамагнетизмом оболонок (другий доданок в (1)) можна знехтувати.

Модифікування МР $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{ГЦ}/\text{OI.Na}/\text{PEG}+\text{ФР}$ АТ HER2 (отримання МР $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{ГЦ}/\text{OI.Na}/\text{PEG}/\text{АТHER2}+\text{ФР}$) здійснювали в динамічному режимі з використанням шейкера.

Встановлено оптимальні параметри дослідних МР на основі магнетиту: концентрація Fe_3O_4 – 14 мг/мл, розмір частинок Fe_3O_4 – 4-22 нм, середній розмір частинок Fe_3O_4 – 10,8 нм; середній розмір частинок Fe_3O_4 , стабілізованих олеатом натрію – 16,8 нм;

намагніченість насичення $M_{\infty} = 14,1 \pm 2,5$ % Гс, гіпсометрична висота – 25 ± 10 % см, в'язкість $\eta = 1,14 \pm 3$ % мПа·с, густина $\rho_{MP} = 1,14 \pm 1,0$ % г/см³, концентрація ГЦ становила 1,25 мг/мл, АТ HER2 – 3,75 мкг/мл.

Концентрація ГЦ і АТ HER2 в таких МР визначається терапевтичною необхідністю. У вихідних МР концентрація ГЦ і АТ HER2 становила 1,25 мг/мл і 3,75 мкг/мл, відповідно, що дозволяє забезпечити необхідні дози лікарського препарату в дослідних зразках шляхом розбавлення вихідної МР. Крім того, така рідина характеризується задовільними реологічними властивостями та седиментаційною стійкістю.

Дослідження впливу експериментальних зразків на життєздатність клітин гепатоцелюлярної карциноми печінки людини лінії HepG2 *in vitro* здійснено на серії таких експериментальних зразків:

1. МР: Fe₃O₄@OINa/PEG+ФР (контроль 1),
2. Гемцитабін (контроль 2),
3. АТ HER2 (контроль 3),
4. МР + ГЦ: Fe₃O₄@ГЦ/OINa/ПЕГ+ФР,
5. МР + АТ: Fe₃O₄@OINa/ПЕГ+ФР+HER2,
6. МР + ГЦ + АТ: Fe₃O₄@ГЦ/OINa/ПЕГ+ФР+HER2,
7. ГЦ + HER2 (контроль 4),
8. ФР (контроль 5).

За результатами досліджень впливу експериментальних зразків на життєздатність клітин ГЦК печінки людини лінії HepG2 виявлено особливості впливу композитної системи МР+ГЦ+АТ (Fe₃O₄@ГЦ/OINa/ПЕГ+ФР+HER2) та кожного її компонента окремо (МР, ГЦ, АТ, ФР, відповідно) на клітини ГЦК. Зокрема:

1. IC₅₀ для МР складала 0,155 мг/мл (контроль 1). В зразках з концентрацією МР більше 0,19 мг/мл кількість живих клітин не визначається, що, вірогідно, обумовлено високою оптичною густиною зразків.

2. АТ HER2 в монозастосуванні (контроль 3) в досліджених концентраціях не впливає на життєздатність або проліферацію клітин карциноми печінки людини лінії HepG2, оскільки його дія не призводить до зниження життєздатності клітин та практично не відрізняється від впливу ФР (контроль 5).

3. Культивування клітин HepG2 одночасно в присутності МР і АТ HER2 за концентрацій, менших 0,05 мг/мл і 0,013 мкг/мл, відповідно, практично не впливало на життєздатність клітин карциноми печінки. Однак, комплексне застосування МР і HER2 в концентрації 0,1 мг/мл і 0,025 мкг/мл, відповідно, зменшувало кількість життєздатних клітин зазначеної лінії до ~ 85,9 %.

4. IC₅₀ для ГЦ дорівнювало 0,015 мг/мл (контроль 2). Дія ГЦ у монозастосуванні в концентрації 0,008 мг/мл залишала в життєздатному стані ~ 78 % клітин. Використання ГЦ у цій концентрації в комплексі з МР (0,1 мг/мл) виявляло синергічну дію та підвищувало ефективність цитостатику на ~ 10 % (кількість живих клітин складала ~ 68 %).

5. Комплексне застосування ГЦ і АТ HER2 (контроль 4) за концентрації 0,008 мг/мл і 0,025 мкг/мл, відповідно, також виявляло синергічну дію, що призводило до зменшення кількості життєздатних клітин до ~ 65 %.

6. Застосування композитної системи, що складається з ГЦ та HER2 в концентраціях 0,008 мг/мл і 0,025 мкг/мл, відповідно, та МР (в концентрації 0,1 мг/мл за Fe₃O₄) призводило до зменшення кількості життєздатних клітин карциноми печінки людини лінії HepG2 до ~ 55 %, що вказує на значний синергічний ефект дії зазначених складових.

Виявлений синергічний цитотоксичний/цитостатичний ефект можна пояснити високою біологічною активністю комплексу з інтегрованим лігандом Fe₃O₄-ГЦ-HER2 внаслідок розпізнавання рецепторів пухлинних клітин HepG2 та фармакологічної корекції

обміну ендogenous заліза, що забезпечується застосуванням залізовмісної МР, ГЦ та АТ HER2.

Дійсно, в механізмах реалізації програми апоптозу внаслідок формування медикаментозного впливу НК суттєву роль відіграють порушення обміну ендogenous заліза в онкоклітинах [46]. Вказані порушення викликають підвищену потребу клітин в залізі, яка задовільняється накопиченням значної кількості наночастинок Fe_3O_4 з МР. Високий рівень «вільного заліза» у формі накопиченого Fe_3O_4 та кислого середовища в клітинах обумовлює прискорене утворення іонів заліза та активних форм кисню (реакція Фентона), що, в свою чергу, призводить до оксидативного стресу клітин та апоптозу. При цьому відбувається також підсилення ефективності дії як ГЦ, так і АТ HER2. Прикладом цього є підвищення на $\sim 10\%$ дії ГЦ при концентрації 0,008 мг/мл у складі МР та виникнення цитотоксичної дії комплексу МР+HER2 на рівні $\sim 10\%$ при концентрації HER2 0,025 мкг/мл, порівняно з відсутністю активності АТ в цих дозах при монозастосуванні.

Таким чином, спільна дія МР, ГЦ та АТ HER2 на клітини лінії HerG2 значно перевершує їх вплив у монозастосуванні в тих же концентраціях, що і обумовлює виявлений синергічний ефект.

Отже, *in vitro* на прикладі впливу нової магнітокерованої колоїдної системи, до складу якої входить магнетит, протипухлинний препарат ГЦ і антитіло HER2, на клітини ГЦК печінки людини лінії HerG2, показана можливість досягнення цитотоксичного ефекту при суттєво менших концентраціях хіміо- і імунотерапевтичних препаратів та створення умов для зменшення токсико-алергічних реакцій організму в цілому. Крім того, отримані експериментальні дані свідчать, що досліджені МР можуть бути перспективними для використання в методі адресної доставки та локальної терапії онкологічних захворювань [85 – 87, 91].

Деякі альтернативні (немагнітні) методи спрямованої доставки ГЦ

У роботі [92] отримували кон'югати гемцитабіну з поліетиленгліколем в якості полімерного носія. Для зменшення метаболічної деградації препарату цитидиндеаміназою кон'югацію здійснювали на рівні N4 аміногрупи піримідинового кільця ГЦ, і залучали –COOH групу PEG. Фолієву кислоту приєднували до аміногрупи PEG головним чином за участю її карбоксильної групи. Фолієва кислота була вибрана для спрямованої доставки кон'югату, оскільки її рецептор надлишково представлений на клітинній поверхні декількох типів раку людини, зокрема яєчників, нирок, матки, мозку, товстої кишки і легенів. Разом з цим у нормальних тканинах людини ці рецептори мають обмежений розподіл, головним чином у нирках, легенях, судинній оболонці очей і плаценті. Фолатний рецептор – це мембранний глікопротеїд з молекулярною масою 38 кДа, локалізований у кавеолах, який бере участь у накопиченні в клітинах фолату шляхом процесу потоцитозу. Його ефективність була показана при застосуванні ліпосом для селективного накопичення в пухлинних клітинах шляхом опосередкованого фолатним рецептором ендоцитозу [93].

Фармакокінетичні криві мали значну залежність від молекулярної маси полімеру, а наявність у кон'югаті фолієвої кислоти у 2–3 рази підвищувала його афінність (спорідненість) до клітин з надлишковою експресією рецепторів фолієвої кислоти [92].

Автори [94] створювали систему доставки лікарського препарату, що містила наночастинок золота як засіб доставки, цетуксимаб (інгібітор рецептора епідермального фактора росту (EGFR), химерне мишаче/людське антитіло, протираковий лікарський засіб) і гемцитабін. У *in vitro* досліджували ефективність системи проти трьох клітинних ліній раку підшлункової залози (PANC-1, AsPC-1 і MIA Paca2) з різним рівнем експресії EGFR. Показано, що поглинання золота корелює з рівнем експресії EGFR. Застосування

такої системи призводило до значного пригнічення проліферації клітин пухлини підшлункової залози *in vitro* і ортотопічного росту пухлини підшлункової залози *in vivo*. Прогресію пухлини контролювали неінвазивним способом шляхом вимірювання біоломінесценції імплантованих пухлинних клітин. Фармакокінетичні дослідження і підрахунок кількості золота *in vitro* та *in vivo* підтвердили, що пригнічення пухлинного росту обумовлено спрямованою доставкою. Ця стратегія може бути застосована як загальний підхід для лікування різноманіття ракових пухлин, що характеризуються надлишковою експресією EGFR [94].

Рецептор епідермального фактора росту надлишково представлений на клітинах багатьох типів раку епітеліального походження, зокрема у 40 – 80 % пацієнтів з діагнозом недрібноклітинного раку легенів. EGFR належить до родини ErbB рецепторів-тирозинкіназ; це трансмембранний глікопротеїд, що складається з зовнішнього домену, який зв'язує ліганд; трансмембранного домену; внутрішньоклітинного домену, що має ферментативну тирозинкіназну активність; і С-кінцевого домену. Активація EGFR відбувається, коли ліганд, такий як епідермальний фактор росту (EGF), зв'язується з зовнішнім доменом і викликає конформаційні зміни, у результаті яких EGFR утворює гомодимер з таким само рецептором чи гетеродимер з іншим рецептором цієї родини, що безпосередньо призводить до активації тирозинкіназного домену і аутофосфорилування з С-кінця залишків тирозину. Цей механізм запускає міжмолекулярний шлях передачі сигналів через каскад послідовних біохімічних реакцій.

EGFR ідентифікується як важлива терапевтична мішень при лікуванні недрібноклітинного раку легенів, тому що високий рівень його експресії призводить до росту і виживання ракових пухлин. Можна здійснити пригнічення EGFR шляхом блокування його зовнішнього домену, що призводить до припинення зв'язування ліганду (такого як EGF) та інгібує активацію рецептора. Еритроаглютинуючий фітогемаглютинін (РНА-Е) має здатність зв'язуватися та інгібувати EGFR, через те що спорідненість РНА-Е до цього рецептора краща, ніж EGF, і взаємодія між РНА-Е та EGFR може блокувати зв'язування EGF. РНА-Е – це ізоформа фітогемаглютиніну, отриманого з квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*). РНА-Е може викликати пригнічення росту і апоптоз клітин, що обумовлено блокуванням шляху передачі сигналів через EGFR і призводить до активації апоптозу через опосередкований мітохондріальними процесами шлях.

Були розроблені флуоресцентні наночастинки желатину (ЖНЧ), на поверхні яких кон'югували РНА-Е і гемцитабін. Наночастинки ЖНЧ–(РНА-Е)–ГЦ можуть проникати в цитоплазму шляхом рецептор-опосередкованого ендоцитозу. Лізосомальні протеази перетравлюють наночастинки, і гемцитабін вивільняється. Гемцитабін викликає порушення ДНК, що призводить до активації білків (p53, Вах, Ваd) і запуску процесів (вихід цитохрому с з мітохондріального міжмембранного простору у цитоплазму, активація каспази-9 і каспази-3), що спричиняють апоптоз.

Для дослідження впливу наночастинок на клітинну проліферацію застосовували методику, що ґрунтується на відновленні тетразолієвого барвника WST-1 до формазану клітинними мітохондріальними дегідрогеназами живих клітин. Це відновлення відбувається лише коли мітохондріальні ферменти-редуктази є активними і, таким чином, безпосередньо пов'язано з кількістю життєздатних клітин. Вимірюється поглинання розчину барвника при 440 нм, результат є пропорційним кількості клітин.

Обробка клітин А-549 протягом 1 дня наночастинками ЖНЧ–ГЦ, ЖНЧ–(РНА-Е)–ГЦ, а також гемцитабіном призводила до пригнічення клітинного росту на 21, 22 і 43 % при концентрації частинок 200 мкг/мл (70 мкг/мл гемцитабіну згідно до адсорбційної ємності). Ці три групи препаратів також призводили до пригнічення росту клітин H292 на 19, 25 і 52 %. Після обробки протягом 2 днів, пригнічення росту, обумовлене ЖНЧ–ГЦ, ЖНЧ–(РНА-Е)–ГЦ і ГЦ, становило 59, 56 і 73 % для клітин А-549 і 67, 71 і 85 % для

клітин H292. Зазначимо, що не спостерігалось пригнічення росту клітин A-549 і H-292 після обробки їх ЖНЧ і ЖНЧ–(РНА-Е).

Для дослідження цитотоксичності застосовували методику вимірювання витоку LDH (лактатдегідрогенази) з цитоплазми пошкоджених клітин в культуральне середовище. Методика дозволяє оцінювати цілісність плазматичної мембрани за кількістю LDH на основі LDH-залежного перетворення NAD⁺ у NADH (нікотинамідаденіндинуклеотид в окисленій і відновленій формах) з наступним відновленням тетразолієвої солі до формазану, шляхом вимірювання поглинання розчину барвника при 490 нм.

Обробка клітин A-549 протягом 1 дня наночастинками ЖНЧ–ГЦ, ЖНЧ–(РНА-Е)–ГЦ та гемцитабіном призводила до цитотоксичності 11, 11 і 11 %. Ці три групи препаратів обумовлювали цитотоксичність 28, 32 і 32 % для клітин H292. Після обробки протягом 2 днів цитотоксичність ЖНЧ–ГЦ, ЖНЧ–(РНА-Е)–ГЦ і ГЦ становила 24, 24 і 28 % для клітин A-549 і 44, 45 і 47 % для клітин H292. Не спостерігалось цитотоксичної дії після обробки ЖНЧ і ЖНЧ–(РНА-Е) порівняно з контрольною групою [95].

Як відомо, ГЦ – хіміотерапевтичний препарат, що застосовується для лікування внутрішньовенним шляхом. Введення препарату таким способом призводить до різних побічних ефектів. Тому розробляється нова нанокмпозитна оральна форма лікарського засобу з метою подолання небажаної дії [96]. Так, отримані наночастинки GemC18-SLNs шляхом сполучення 4-(N)-стеароїлгемцитабіну (GemC18) з твердими ліпідними наночастинками (SLNs), приготованими з соєвого лецитину, GMS (моностеарат гліцеролу), Tween 20 і 1,2-дистеароїл-sn-гліцеро-3-фосфоетаноламін-N-[аміно (поліетиленгліколю)-2000]. GemC18 – це ліпофільні амідні проліки гемцитабіну, слабо розчинні у воді, їх розчинність становить 1.38 ± 1.60 мкг/мл. Розмір наночастинок GemC18-SLNs – 98 ± 10 нм, а їх дзета-потенціал – близько – 46 мВ.

У клітинній культурі (досліди *in vitro*) гемцитабін і GemC18 мали більшу цитотоксичну дію, ніж GemC18-SLNs. Коли наночастинки GemC18-SLNs застосовували внутрішньовенно, вони виявлялися значно ефективнішими, ніж вільний гемцитабін чи проліки GemC18 в еквівалентній молярній концентрації, для інгібування пухлинного росту на моделях мишей з пухлинами легенів чи підшлункової залози, і GemC18-SLNs можуть долати резистентність пухлинних клітин до гемцитабіну.

У роботі [97] досліджували протипухлинну активність GemC18-SLNs, які вводили орально мишам. Однак, для з'ясування механізмів, що обумовлюють здатність GemC18-SLNs підвищувати системну ефективність гемцитабіну при оральному прийомі, потрібно проводити додаткові експерименти.

Показано [98], що білки-переносники нуклеозидів hENT1, hCNT1 і hCNT3 відіграють важливу роль у проникненні ГЦ через клітинну мембрану. Пригнічення експресії hENT1 у пухлинних клітинах часто є причиною стійкості до гемцитабіну, наприклад у випадку раку підшлункової залози. З метою подолання резистентності до гемцитабіну, обумовленої низькою експресією hENT1, були розроблені наночастинки ГЦ-САЛ-НЧ. Для підвищення ліпофільних властивостей гемцитабіну здійснювали сполучення миристоїлу з 4-аміногрупою ГЦ, отримуючи 4-N-миристоїл-ГЦ (ГЦ-С14), який інкапсулювали в наночастинки сироваткового альбуміну людини САЛ-НЧ. Такі наночастинки мали середній розмір 150 ± 27 нм і характеризувалися пролонгованим вивільненням препарату. Дослідження показали, що частинки розміром до 100 – 200 нм можуть поглинатися клітинами шляхом опосередкованого рецептором ендцитозу.

Пригнічення клітинної проліферації ГЦ-САЛ-НЧ відбувалося в залежності від концентрації наночастинок. ГЦ-САЛ-НЧ і ГЦ-С14 мали здатність викликати зупинку клітинного циклу і апоптоз. На відміну від ГЦ, ці два препарати були ефективними при

низькій активності hENT1. Вхідження ГЦ-САЛ-НЧ у пухлинні клітини відбувалося шляхом ендоцитозу, і тому низька експресія hENT1 не впливала на цей процес.

Досліджували біотоксичність ГЦ-САЛ-НЧ *in vivo* на моделі мишей КМ, яким вводили 200 мкл нормального розчину, ГЦ і ГЦ-САЛ-НЧ шляхом ін'єкції у хвостову вену на 0, 3, 6 і 9 день (гемцитабін у кількості 40 мг/кг маси тіла і еквівалентна кількість ГЦ-САЛ-НЧ). Протягом 12 днів не спостерігалось значних відмінностей середньої маси тіла мишей у всіх трьох групах. На 12 день досліджували гематологічні параметри і біохімічні показники кожної миші. Результати показали, що ГЦ-САЛ-НЧ мають низьку біотоксичність [98].

Новий нанобіокон'югат на основі хітозану був розроблений для специфічної доставки ГЦ і анти-EGFR антитіла до пухлинних клітин підшлункової залози. Наночастинки мали сферичну форму, незначний розкид розмірів, високу дисперсність. Вихід ГЦ з наноконструкції відбувався протягом 8–24 год. Поглинання мікросфер клітинами SW1990 було більшим при наявності в їх композиції антитіл, поступово зростаючи з часом (6–12 год). Середня кількість наночастинок у клітинах SW1990 була значно більшою для наноконструкції, що містив антитіла і гемцитабін (група Abc), порівняно з кон'югатом, що містив ГЦ і не містив антитіл (група Gc). Проліферація клітин SW1990 знижувалася після обробки нанобіокон'югатом. Утворення клітинних колоній пригнічувалося в обох групах нанобіокон'югатів, але різниця між групами Abc і Gc була значною. Показано, що підвищений рівень експресії білків PCNA (ядерний антиген проліферуючих клітин) і Ki-67 (ядерний білок, асоційований з клітинною проліферацією) у клітинах SW1990 знижувався після обробки нанобіокон'югатами обох груп. Нанобіокон'югати пригнічували міграцію клітин SW1990 та їх інвазію [99].

Цисплатин разом з гемцитабіном застосовуються в стандартному режимі лікування прогресуючого недрібноклітинного раку легенів. Мета дослідження [100] полягала в приготуванні біосумісного полімерного препарату, що підлягає деградації в біологічних системах, для синергетичної обробки карциноми легенів.

Комплекс платини Pt(IV) з карбоксильною групою приєднували до аміногрупи хітозану (X), отримуючи кон'югат X-Pt з позитивним зарядом. ГЦ через аміногрупу приєднували до карбоксильної групи гіалуронової кислоти (ГК), отримуючи кон'югат ГК-ГЦ з негативним зарядом. За методикою нашарування отримували наночастинки ГК-ГЦ/X-Pt, що склалися з серцевини X-Pt, вкритої шаром ГК-ГЦ. Досліджували фізико-хімічні властивості наночастинок, цитотоксичну дію *in vitro* на клітини недрібноклітинного раку легенів людини (NCl-H460) і протипухлинну активність *in vivo* на моделях мишей з прищепленими клітинами NCl-H460.

Наночастинки ГК-ГЦ/X-Pt мали розмір близько 187 нм, їх дзета-потенціал становив – 21 мВ, ефективність інкапсуляції препаратів була високою – 90 %. Обробка ГК-ГЦ/X-Pt призводила до значного підвищення цитотоксичності *in vitro* та протипухлинної дії *in vivo*, порівняно з наночастинками, що містили єдиний препарат, і розчинами вільних препаратів [100].

Приєднання скваленової кислоти до гемцитабіну (SQgem) використовується в клініці для обробки солідних пухлин, таких як раку бронхів (недрібноклітинного), чи локалізованого чи метастатичного, раку підшлункової залози, сечового міхура і молочної залози. Гемцитабін швидко метаболізується під дією дезоксицитидиндеамінази – ферменту, який знаходиться в організмі переважно в крові, печінці та нирках, утворюючи похідне урацилу, що виявляється повністю неактивним. Окрім того, молекула гемцитабіну значною мірою гідрофільна, і це обмежує її пасивну дифузію крізь цитоплазматичну мембрану. Внутрішньоклітинне проникнення гемцитабіну може бути здійснене лише шляхом активного транспорту за участю білку-переносника нуклеозидів hENT1. Пригнічення експресії цього переносника часто обумовлює стійкість (резистентність) до

лікування, що відбувається, наприклад, у випадку раку підшлункової залози. Коли гемцитабін з'єднується зі скваленовою кислотою, отримане похідне у вигляді наночастинок розміром 130 нм може застосовуватися внутрішньовенно.

Дослідження *in vitro* показали, що на відміну від вільного гемцитабіну, наночастинок SQgem стабільні в середовищі плазми крові, оскільки не підлягають метаболічному перетворенню. Вони вивільняють гемцитабін під дією внутрішньоклітинних ферментів. Механізм виходу гемцитабіну з наночастинок SQgem під дією внутрішньоклітинних ферментів вивчали в [101].

Висновки

Одна з основних проблем сучасної протипухлинної терапії гемцитабіном полягає в токсичності і слабкій біодоступності препарату. В останні роки значно зріс інтерес до використання природних механізмів ендоцитозу для доставки лікарських препаратів до живих клітин із залученням лігандів, таких як гормони, вітаміни і фактори росту, спрямованих проти асоційованих з пухлинами рецепторів, які надлишково представлені на поверхні пухлинних клітин і мають обмежений розподіл у нормальних тканинах. На цей час методами сучасної нанотехнології активно розробляються магніточутливі та немагнітні кон'югати для доставки ГЦ мішене-спрямованим способом до злоякісних клітин, що дозволить зменшити його системну токсичність. Перевагою, яка надає застосування кон'югації лікарського препарату на поверхні наночастинок для доставки лікарських засобів *in vivo*, є повільне вивільнення препарату, що потенційно забезпечує більш тривалу присутність лікарського засобу в потоці крові на необхідному рівні. Позитивним результатом використання гіпертермії в поєднанні з вивільненням ліків може бути поліпшення стану пацієнта та зменшення частоти прийому ліків.

Незважаючи на значну кількість успішних досліджень щодо застосування магнітних наночастинок як тераностичного матеріалу, а також багаторазові успішні результати на малих тваринних моделях, до цього часу вони не задовольняють клінічні потреби. Але при досягненні високої ємності по відношенню до лікарського препарату, збільшенні специфічності і спорідненості до пухлинних клітин, поєднанні томографії та мультимодальної локальної терапії, магнітні наночастинок можуть стати зручними для клінічного використання в найближчому майбутньому і значно вплинути на ефективність лікування онкологічних захворювань.

Література

1. Інтернет ресурс: МОЗ України. 1.02.2019. Точка доступу: <https://www.kmu.gov.ua/ua/news/moz-pro-te-yak-zminuyutsya-pidhodi-do-viyavlennya-onkologichnih-hvorob-i-likuvannya-raku>
2. Інтернет ресурс: Вікіпедія. Гемцитабін. Точка доступу: <https://uk.wikipedia.org>
3. Л.В. Манзюк. Гемцитабин в химиотерапии некоторых солидных опухолей // Русский медицинский журнал. – 2003. – № 11. – С.637–640.
4. Гуторов С.Л. Гемцитабин и пеметрексед: новые результаты химиотерапии солидных опухолей // Фарматека. – 2005. – № 21. – С.16–21.
5. Гуторов С.Л., Семенова Н.Н., Загрекова Е.И. Новые лекарства в лечении солидных опухолей // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9, № 22. – С. 1017–1020.
6. Plentz R.R., Malek N.P. Systemic therapy of Cholangiocarcinoma // Visceral Medicine. – 2016. – V.32, № 6. – P. 427–430.
7. Jain A., Kwong L.N., Javle M. Genomic profiling of biliary tract cancers and implications for clinical practice // Current treatment options in oncology. – 2016. – V. 17, № 11. – P. 58–71.

8. Интернет ресурс. Гемцитабин. Недавние этапы II и III клинических испытаний в метастатическом раке поджелудочной железы. Пер. с англ. Н. Д. Фирсова (2017). Точка доступа: <https://www.meir-health.ru>
9. Kang T.W., Yevsa T., Woller N., Hoenicke L., Wuestefeld T., Dauch D., Hohmeyer A., Gereke M., Rudalska R., Potapova A., Iken M., Vucur M., Weiss S., Heikenwalder M., Khan S., Gil J., Bruder D., Manns M., Schirmacher P., Tacke F., Ott M., Luedde T., Longerich T., Kubicka S., Zender L. Senescence surveillance of premalignant hepatocytes limits liver cancer development // *Nature*. – 2011. – V. 9. – P. 547–551.
10. Yevsa T., Kang T.W., Zender L. Immune surveillance of pre-cancerous senescent hepatocytes limits hepatocellular carcinoma development // *Oncoimmunology*. – 2012. – № 1. – P. 398–399.
11. Schneider C., Teufel A., Yevsa T., Staib F., Hohmeyer A., Walenda G., Zimmermann H.W., Vucur M., Huss S., Gassler N., Wasmuth H.E., Lira S.A., Zender L., Luedde T., Trautwein C., Tacke F. Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer // *Gut*. – 2012. – № 61. – P. 1733–1743.
12. Reinhardt A., Yevsa T., Worbs T., Lienenklaus S., Sandrock I., Oberdorfer L., Korn T., Weiss S., Forster R., Prinz I. Interleukin-23-dependent γ/δ t cells produce interleukin-17 and accumulate in the entheses, aortic valve, and ciliary body in mice // *Arthritis Rheumatol.* – 2016. – V. 68, №10. – P. 2476–2486.
13. Wolf B., Krieg K., Falk C., Breuhahn K., Keppeler H., Biedermann T., Schmid E., Warmann S., Fuchs J., Vetter S., Thiele D., Nieser M., Avci-Adali M., Skokowa Y., Schöls L., Hauser S., Ringelhahn M., Yevsa T., Heikenwalder M., Kossatz-Boehlert U. Inducing differentiation of premalignant hepatic cells as a novel therapeutic strategy in hepatocarcinoma // *Cancer Res.* – 2016. – V. 76, № 18. – P. 5550–5561.
14. Горобець С. В., Горобець О. Ю., Горбик П. П., Уварова І. В. Функціональні біо- та наноматеріали медичного призначення. – К.: Кондор, 2018. – 479 с.
15. Уварова І.В., Горбик П.П., Горобець С.В., Іващенко О.А., Ульяновченко Н.В. Наноматеріали медичного призначення. За ред. В.В. Скорохода. – Київ: Наукова думка, 2014. – 415 с.
16. Roco M.C., Williams R.S., Alivisatos P. Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade. – Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2002. – V. 156. – 171 p.
17. Levy L., Sahoo Y., Earl B. J. Synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications // *Chem. Mater.* – 2002. – № 14. – P. 3715–3721.
18. Горбик П.П., Дубровин И.В., Петрановская А.Л., Турелик М.П. Магнитоуправляемый транспорт лекарственных препаратов: современное состояние разработки и перспективы // *Поверхность*. – 2010. – Вып. (2)17. – С. 287 – 297.
19. Горбик П.П., Петрановская А.Л., Турелик М.П., Абрамов Н.В, Туранская С.П., Пилипчук Е.В., Чехун В.Ф., Лук'янова Н.Ю., Шпак А.П., Кордубан А.М. Проблема направленного транспорта лекарственных препаратов: состояние и перспективы // *Хімія, фізика та технологія поверхні*. – 2011. – Т. 2, № 4. – С. 433–441.
20. Аляутдин Р. Н., Кройтер Й., Харкевич Д. А. Доставка лекарственных препаратов в мозг с помощью наночастиц // *Эксперим. и клин. фармакология*. – 2003. – Т. 66, № 2. – С. 65–68.
21. Горбик П. П., Петрановська А. Л., Сторожук Л. П. та ін. Нанокompозити на основі магнетиту // *Укр. хім. журн.* – 2007. – Т. 73, № 5. – С. 24–29.
22. Березов Т., Яглова Н., Дмитриева Т. и др. Направленный транспорт лекарственных средств с помощью липосом // *Вест. Рос. АМН*. – 2004. – № 3. – С. 42–51.
23. Брегадзе В.И., Сиваев И.Б. Лекарство-снайпер или химический прицел для нейтрона // *Природа*. – 2004. – № 4. – С. 1–12.

24. *Гречко Л.Г., Горбик П.П., Лерман Л.Б., Чуйко О.О.* Можливість використання магнітних наночасток як засобів транспорту і утримання лікарських препаратів в органі мішені // Доп. НАН України. – 2006. – № 2. – С. 181–191.
25. *Горбик П.П., Дубровін І.В., Петрановська А.Л. та ін.* Магніточутливий носій лікарських препаратів на основі ультрадисперсних магнетитполіакриламідних частинок // Доп. НАН України. – 2005. – № 4. – С. 224–228.
26. *Федоренко О.М., Петрановська А.Л., Дзюбенко Л.С., Горбик П.П. та ін.* Рідиннофазне модифікування поверхні магнетиту γ -АПС // Доп. НАН України. – 2006. – № 1. – С. 157–168.
27. *Усов Д.Г., Петрановська А.Л., Турелик М.П., Горбик П.П. та ін.* Синтез та фізико-хімічні властивості нанокомпозитів на основі магнетиту, модифікованого мезо-2, 3-димеркаптосукциновою кислотою // Поверхность: межвед. сб. науч. тр. – 2009. – С. 320–331.
28. *Горбик П. П., Міщенко В.М., Петрановська А.Л. та ін.* Синтез нанокомпозитів магнетит/гідроксиапатит та дослідження їх властивостей // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2009. – 6, № 4. – С. 1273–1281.
29. *Шпак А., Горбик П.* Фізико-хімія наноматеріалів і супрамолекулярних структур. – К.: Наук. думка, 2007. – Т. 1. – 428 с.
30. *Nanomaterials and Supramolecular Structures: physics chemistry and applications / ed. by A. P. Shpak, P. P. Gorbyk.* – Netherlands: Springer, 2009. – 425 p.
31. *Горбик П. П.* Нанокомпозити з функціями медико-біологічних нанороботів: синтез, властивості, застосування // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2013. – 11, № 2. – С. 323–436.
32. *Пат. UA 99211.* Нанокapsула з функціями наноробота / Горбик П.П., Петрановська А.Л., Турелик М. П. та ін. – Опубл. 2012.
33. *Gorbyk P.P., Lerman L.B., Petranovska A.L., Turanska S.P.* Magnetosensitive Nanocomposites with Functions of Medico-Biological Nanorobots: synthesis and properties // *Advances in Semiconductor Research: physics of nanosystems, spintronics and technological applications.* – 2014. –P. 161–198.
34. *Gorbyk P.P., Lerman L.B., Petranovska A.L. et al.* Magnetosensitive Nanocomposites with Hierarchical Nanoarchitecture as Biomedical Nanorobots: synthesis, properties and application // *Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials, Applications of Nanobiomaterials.* – 2016. – P. 289–334.
35. *Abramov M.V., Kusyak A.P., Kaminskiy O.M., Turanska S.P., Petranovska A.L., Kusyak N.V., Gorbyk P.P.* Magnetosensitive Nanocomposites Based on Cisplatin and Doxorubicin for Application in Oncology / *Horizons in World Physics.* – 2017. –P. 1–56.
36. *Pylypchuk E., Kolodynska D., Gorbyk P.P.* Gd(III) Adsorption on the DTPA-functionalized chitosan/magnetite nanocomposites // *Separation Science and Technology.* – 2018. – V. 53, № 7. – P. 1006–1016.
37. *Petranovska A.L., Abramov N.V., Turanska S.P., Gorbyk P.P., Kaminskiy A.N., Kusyak N.V.* Adsorption of cis-dichlorodiammineplatinum by nanostructures based on single-domain magnetite // *J. Nanostruct. Chem.* – 2015. – V. 5. – P. 275–285.
38. *Abramov N.V., Turanska S.P., Kusyak A.P., Petranovska A.L., Gorbyk P.P.* Synthesis and properties of magnetite/hydroxyapatite/doxorubicin nanocomposites and magnetic fluids based on them // *J. Nanostruct. Chem.* – 2016. – V. 6. – P. 223–233.
39. *Gorbyk P.P., Chekhun V. F.* Nanocomposites of Medicobiologic Destination: reality and perspectives for oncology // *Funct. Mater.* – 2012. – V. 19, № 2. – P. 145–156.
40. *Pylypchuk I.V., Abramov M.V., Petranovska A. L., Turanska S. P., Budnyak T. M., Kusyak N.V., Gorbyk P.P.* Multifunctional Magnetic Nanocomposites on the Base of Magnetite

and Hydroxyapatite for Oncology Applications // In book International Conference on Nanotechnology and Nanomaterials. – 2017. – P. 35–47.

41. Горбик П.П., Махно С.М., Дубровін І. В. та ін. Синтез і властивості наноструктур, поглинаючих надвисокочастотне електромагнітне та нейтронне випромінення // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2017. – Т. 15, № 1. С. 47–82.

42. Горбик П.П., Абрамов М.В., Дубровін І.В. та ін. Синтез та властивості нанорозмірних однодомених феритів-шпінелей // Успехи физ. мет. – 2017. – Т. 18, №1. – С. 59–105.

43. Абрамов М.В., Туранська С.П., Горбик П.П. Магнетні властивості нанокompозитів типу суперпарамагнетне ядро—оболонка // Металлофиз. новейшие технол. – 2018. – Т. 40, № 4. – С. 423–500.

44. Абрамов М.В., Туранська С.П., Горбик П.П. Магнітні властивості рідин на основі поліфункціональних нанокompозитів типу суперпарамагнітне ядро—багаторівнева оболонка // Металлофиз. новейшие технол. – 2018. – Т. 40, № 10. – С. 1283–1348.

45. Інтернет ресурс: Протипухлинний нанокompозит «Фероплат». Точка доступу: <http://files.nas.gov.ua/NASDevelopmentsBook/PDF/0760.pdf>

46. Лук'янова Н.Ю. Експериментальне обґрунтування ефективності використання феромагнітного нанокompозиту у подоланні резистентності пухлинних клітин до цисплатину: автореф. дис. ... докт. біол. наук. / ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. – Київ, 2015. – 52 с.

47. Патент UA 78473 Магнітна протипухлинна рідина / Патон Б.Є., Горбик П.П., Петрановська А.Л., Турелик М.П., Абрамов М.В., Васильєва О.А., Чехун В.Ф., Лук'янова Н.Ю. – Опубл. 2013.

48. Патент UA 112490 Протипухлинний феромагнітний нанокompозит / Чехун В.Ф., Лук'янова Н.Ю., Горбик П.П., Тодор І.М., Петрановська А.Л., Бошицька Н.В., Божко І.В. – Опубл. 2016.

49. Абрамов М.В., Кусяк А.П., Камінський О.М., Туранська С.П., Петрановська А.Л., Кусяк Н.В., Туров В.В., Горбик П.П. Синтез та властивості магніточутливих поліфункціональних нанокompозитів для застосування в онкології // Поверхность. – 2017. – Вып. 9(24). – С. 165–198.

50. Кусяк А.П., Туранська С.П., Неуєн М.Х., Горбик П.П. Взаємодія магніточутливих наноматеріалів і нанокompозитів з клітинами, вірусами, біоактивними молекулами, іонами важких металів // Поверхность. – 2017. – Вып. 9(24). – С. 211–247.

51. Абрамов М.В., Петрановська А.Л., Пилипчук Є.В., Туранська С.П., Опанащук Н.М., Кусяк Н.В., Горобець С.В., Горбик П.П. Магніточутливі поліфункціональні нанокompозити на основі магнетиту і гідроксиапатиту для застосування в онкології // Поверхность. – 2018. – Вып. 10(25). – С. 245–285.

52. Arias J.L., Reddy L.H., Couvreur P. Fe₃O₄/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer // J. Mater. Chem. – 2012, V. 22. – P. 7622–7632.

53. Popescu R.C., Andronescu E., Vasile B.S., Truscă R., Boldeiu A., Mogoantă L., Mogosanu G.D., Temelie M., Radu M., Grumezescu A. M., Savu D. Fabrication and Cytotoxicity of Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles // Molecules. – 2017/ – V. 22, № 7. – P. 1080–1106.

54. Iglesias G.R., Reyes-Ortega F., Checa Fernandez B.L., Delgado Á.V. Hyperthermia-Triggered Gemcitabine Release from Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles // Polymers. – 2018. – V. 10, № 3. – P. 269–284.

55. Патент UA 118524 Нанокompозитний матеріал / Горбик П.П., Петрановська А.Л., Абрамов М.В., Туранська С.П., Пилипчук Є.В., Опанащук Н.М., Куліш М.П., Дмитренко О.П., Буско Т.О., Павленко О.Л., Горобець С.В. – Опубл. 2019.

56. *Meijia Wu, Shengwu Huang.* Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment (Review) // *Molecular and clinical oncology.* – 2017. – № 7. – P. 738–746.
57. *Lazhen Shen, Bei Li, Yongsheng Qiao.* Fe₃O₄ Nanoparticles in Targeted Drug/Gene Delivery Systems // *Materials.* – 2018. – № 11. – P. 1-29.
58. *Bae Y.B., Park K.* Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility // *J. Controll. Release.* – 2011. – № 153. – P. 198–205.
59. *Popescu R.C., Grumezescu A.M.* Magnetite Nanostructures with Applications in Cancer Therapy // *Curr. Proteom.* – 2014. – № 11. – P. 128–138.
60. *Joubert F., Martin L., Perrier, S., Pasparakis G.* Development of a gemcitabine-polymer conjugate with prolonged cytotoxicity against a pancreatic cancer cell line // *ACS Macro Lett.* – 2017. – № 6. – P. 535–540.
61. *Viota J.L., Carazo A., Munoz-Gamez J.A., Rudzka K., Gómez-Sotomayor R., Ruiz-Extremera A., Salmerón J., Delgado A.V.* Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to tumor cells. Physicochemical in vitro evaluation // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2013. – № 33. – P. 1183–1192.
62. *Li H., Ke F., An Y., Hou X., Zhang H., Lin M., Zhang D.* Gemcitabine-loaded magnetic albumin nanospheres for cancer chemohyperthermia // *J. Nanopart. Res.* – 2013. № 15. – P. 1513-1524.
63. *Wang L., An Y., Yuan C., Zhang H., Liang C., Ding F., Gao Q., Zhang D.* GEM-loaded magnetic albumin nanospheres modified with cetuximab for simultaneous targeting, magnetic resonance imaging, and double-targeted thermochemotherapy of pancreatic cancer cells // *Int. J. Nanomed.* – 2014. – № 10. – P. 2507–2519.
64. *Massart R.* Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE trans // Magn.* – 1981. – № 17. – P. 1247–1248.
65. *Mayti D., Agrawal D.C.* Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles under Oxidizing Environment and Their Stabilization in Aqueous and Non-Aqueous Media // *J. Magn. Magn. Mater.* – 2007. – № 308. – P. 46–55.
66. *Jiang W., Lai K.L., Hu H., Zeng X.-B., Lan F., Liu F., Liu K.-X., Wu Y., Gu Z.-W.* The effect of [Fe³⁺]/[Fe²⁺] molar ratio and iron salts concentration on the properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the water/ethanol/toluene system // *J. Nanopart. Res.* – 2011. – № 13. – P. 5135–5147.
67. *Malik M.A., Wani M.Y., Hashim M.A.* Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials // *1st Nano Update. Arabian J. Chem.* – 2012. – № 5. – P. 397–417.
68. *Moore T.L., Rodriguez-Lorenzo L., Hirsch V., Balog S., Dominic Urban D., Jud C., Rothen-Rutishauser B., Lattuada M., Petri-Fink A.* Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – № 44. – P. 6287–6305.
69. *Ahlberg S., Antonopulos A., Diendorf J., Dringen R., Epple M., Flöck R., Goedecke W., Graf C., Haberl N., Helmlinger J., et al.* PVP-Coated, negatively charged silver nanoparticles // *J. Nanotechnol.* – 2014. – № 5. – P. 1944–1965.
70. *Yu S.-M., Laromaine A., Roig A.* Enhanced stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological media using a pH adjusted—BSA adsorption protocol // *J. Nanopart. Res.* – 2014. – № 16. – P. 2484.
71. *Wiogo H., Lim M., Bulmus V., Gutiérrez L., Woodward R.C., Amal R.* Insight into Serum Protein Interactions with Functionalized Magnetic Nanoparticles in Biological Media // *Langmuir.* – 2012. – № 28. – P. 4346–4356.
72. *Popescu R.C., Andronescu E., Grumezescu A.M.* In vivo evaluation of Fe₃O₄ nanoparticles // *Rom. J. Morphol. Embryol.* – 2014. – № 55. – P. 1013–1018.

73. Mahdavi M., Ahmad M.B., Haron M.J., Namvar F., Nadi B., Rahman M.Z.A., Amin J. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications // *Molecules*. – 2013. – № 18. – P. 7533–7548.

74. Chen D.Z., Tang Q.S., Li X.D., Zhou X.J., Zhang J., Xue W.Q., Xiang J.Y., Guo C.Q. Biocompatibility of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells // *Int. J. Nanomed.* – 2012. – № 7. – P. 4973–4982.

75. Sabella S., Carney R.P., Brunetti V., Malvindi M.A., Al-Juffali N., Vecchio G., Janes S.M., Bakr O.M., Cingolani R., Stellacci F., et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles // *Nanoscale*. – 2014. – № 6. – P. 7052–7061.

76. Cottin S., Ghani K., de Campos-Lima P.O., Caruso M. Gemcitabine intercellular diffusion mediated by gap junctions: New implications for cancer therapy // *Mol. Cancer*. – 2010. – № 9. – P. 141.

77. Quinto C.A., Mohindra P., Tong S., Bao G. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment // *Nanoscale*. – 2015. – № 7. – P. 12728–12736.

78. Schlorf T., Meincke M., Kossel E., Glueer C.C., Jansen O., Mentlein R. Biological Properties of Iron Oxide Nanoparticles for Cellular and Molecular Magnetic Resonance Imaging // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – № 12. – P. 12–23.

79. Singh R., Shakya A.K., Naik R., Shalan N. Stability-Indicating HPLC Determination of Gemcitabine in Pharmaceutical Formulations // *Int. J. Anal. Chem.* – 2015. – P. 862592.

80. Parsian M., Unsoy G., Mutlu P., Yalcin S., Tezcaner A., Gunduz U. Loading of Gemcitabine on chitosan magnetic nanoparticles increases the anti-cancer efficacy of the drug // *Eur. J. Pharmacol.* – 2016. – № 784. – P. 121–128.

81. Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems // *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* – 2010. – № 67. – P. 217–223.

82. Jaidev L.R., Krishnan U.M., Sethuraman S. Gemcitabine loaded biodegradable PLGA nanospheres for in vitro pancreatic cancer therapy // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2015. – № 47. – P. 40–47.

83. Cherie Ann Kruger, Heidi Abrahamse. Utilisation of Targeted Nanoparticle Photosensitiser Drug Delivery Systems for the Enhancement of Photodynamic Therapy // *Molecules*. – 2018. – № 23. – P. 1–21.

84. Qingxin Mu, Guanyou Lin, Victoria K. Patton, Kui Wang, Oliver W. Press, Miqin Zhang. Gemcitabine and chlorotoxin conjugated iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy // *Journal of Materials Chemistry*. – 2016.

85. Petranovska A.L., Abramov M.V., Opanashchuk N.M., Turanska S.P., Kusyak N.V., Gorbyk P.P. Synthesis and properties of magnetically sensitive nanocomposites based on magnetite and gemcitabine // *Chemistry, Physics and Technology of Surface*. – 2018. – V. 9, № 4. – P. 353–361.

86. Петрановська А.Л., Абрамов М.В., Опанащук Н.М., Павловська О.Ф., Кусяк Н.В., Горбик П.П., Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф. Синтез магнітних рідин на основі магнетиту, гемцитабіну і антитіла CD340 та дослідження їх властивостей // *Матеріали конф. «Сучасне матеріалознавство: фізика, хімія, технології (СМФХТ – 2019)»* – 2019. – С. 201–203.

87. Opanaschuk N.M., Petranovska A.L., Gorbyk P.P., Kusyak N.V., Lukianova N.Y., Chahun V.F. The investigation into a cytotoxic action of vector magnetic liquids with adsorbed gemcitabine in vitro // *Ukrainian Conference with International Participation Chemistry, physics and technology of surface and workshop metal-based biocompatible nanoparticles: Synthesis And Applications. Book of abstracts*. – 2019. – P. 133.

88. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни, пер. 5-го англ. изд. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — 691 с.

89. Зеленцов В.И., Дацко Т.Я. Применение адсорбционных моделей для описания равновесия в системе оксигидроксид алюминия – фтор // Электронная обработка материалов. – 2012. – Т. 48(6). – 65–73.

90. Chen D.-X., Sun N., Gu H.-C. Size analysis of carboxydextran coated superparamagnetic iron oxide particles used as contrast agent of magnetic resonance imaging // J. App. Phys. – 2009. – V. 106, № 6. – P. 63906–63909.

91. Petranovska A.L., Abramov M.V., Opanashchuk N.M., Kusyak N.V., Kusyak A.P., Turanska S.P., Gorobets S.V., Gorbyk P.P., Lukianova N.Yu., Chekhun V.F. Magnetically sensitive nanocomposites and magnetic fluids based on magnetite, gemcitabine and HER2 antibody // Ukrainian Conference with International Participation Chemistry, physics and technology of surface and workshop metal-based biocompatible nanoparticles: synthesis and applications. Book of abstracts. – 2019. – P. 134.

92. Gianfranco Pasut, Fabiana Canal, Lisa Dalla Via, Silvia Arpicco, Francesco M. Veronese, Oddone Schiavon. Antitumoral activity of PEG – gemcitabine prodrugs targeted by folic acid // Journal of Controlled Release. – 2008. – P. 239–248.

93. Shmeeda H., Mak L., Tzemach D., Astrahan P., Tarshish M., Gabizon A. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors // Mol. Cancer Ther. – 2006. – V. 5, № 4. – P. 818 – 824.

94. Chitta Ranjan Patra, Resham Bhattacharya, Enfeng Wang, Aaron Katarya, Julie S. Lau, Shamit Dutta, Michael Muders, Shanfeng Wang, Sarah A. Buhrow, Stephanie L. Safgren, Michael J. Yaszemski, Joel M. Reid, Matthew M. Ames, Priyabrata Mukherjee, Debabrata Mukhopadhyay. Targeted Delivery of Gemcitabine to Pancreatic Adenocarcinoma Using Cetuximab as a Targeting Agent // Cancer Res. – 2008. – № 6. – P. 68.

95. Wei-Ting Kuo, Jian-Yuan Huang, Min-Hua Chen, Ching-Yun Chen, Yan-Jye Shyong, Ko-Chung Yen, Yu-Jun Sun, Cherng-Jyh Ke, Yung-Hsin Cheng, Feng-Huei Lin. Development of gelatin nanoparticles conjugated with phytohemagglutinin erythroagglutinating loaded with gemcitabine for inducing apoptosis in non-small cell lung cancer cells // J. Mater. Chem. – 2016.

96. Atyabi F., Hosseinzadeh H., Dinarvand R., Ostad S. Preparation and characterization of gemcitabine nanoparticles // Research in Pharmaceutical Sciences. – 2012. – V. 7, № 5. – P. 236

97. Caixia Wang, Yuanqiang Zheng, Michael A. Sandoval, Solange A. Valdes, Zhe Chen, Dharmika S. Lansakara-P, Maolin Du, Yanchun Shi, Zhengrong Cui. Oral 4-(N)-stearoyl gemcitabine nanoparticles inhibit tumor growth in mouse models // Oncotarget. – 2017. – V. 8, № 52. – P. 89876–89886

98. Zhongyi Guo, Feng Wang, Yang Di, Lie Yao, Xinzhe Yu, Deliang Fu, Ji Li, Chen Jin. Antitumor effect of gemcitabine-loaded albumin nanoparticle on gemcitabine-resistant pancreatic cancer induced by low hENT1 expression // Int J Nanomedicine. – 2018. – V. 13. – P. 4869–4880.

99. Xiao J, Yu H. Gemcitabine Conjugated Chitosan and Double Antibodies (Abc-GC-Gemcitabine Nanoparticles) Enhanced Cytoplasmic Uptake of Gemcitabine and Inhibit Proliferation and Metastasis In Human SW1990 Pancreatic Cancer Cells // International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2017. – V. 23. – P. 1613–1620.

100. Zhang R, Ru Y, Gao Y, Li J, Mao S. Layer-by-layer nanoparticles co-loading gemcitabine and platinum (IV) prodrugs for synergistic combination therapy of lung cancer // Drug Des Devel Ther. – 2017. – V. 11. – P. 2631–2642.

101. Laurent Louis, Ghyselen Bruno, Fermon Claude and other Nanosciences and Nanotechnology: Evolution or Revolution? – Springer, 2016. – 438 p. ISBN-13: 978-3319193595

References

1. Internet resource: Ministry of Health of Ukraine. 02/02/2019 Access point: <https://www.kmu.gov.ua/ua/news/moz-pro-te-yak-zminyuyutsya-pidhodi-do-viyavlennya-onkologichnih-hvorob-i-likuvannya-raku>
2. Internet resource: Wikipedia. Gemcitabine. Access point: <https://uk.wikipedia.org>
3. Manzyuk L.V. Gemcitabine in chemotherapy of some solid tumors. *Russian Medical Journal*. 2003. 11: 637. [in Russian].
4. Gutorov S.L. Gemcitabine and pemetrexed: new results from chemotherapy for solid tumors. *Pharmateka*. 2005. 21: 16. [in Russian].
5. Gutorov S.L, Semenova N.N, Zagrekova E.I. New drugs in the treatment of solid tumors. *Russian Medical Journal*. 2001. 9(22): 1017. [in Russian].
6. Plentz R.R., Malek N.P. Systemic therapy of Cholangiocarcinoma. *Visceral Medicine*. 2016. 32(6): 427.
7. Jain A., Kwong L.N., Javle M. Genomic profiling of biliary tract cancers and implications for clinical practice. *Current treatment options in oncology*. 2016. 17(11): 58.
8. Internet resource. Gemcitabine. Recent stages II and III clinical trials in metastatic pancreatic cancer. Trans. with English. N. D. Firsova (2017). Access point: <https://www.meir-health.ru>
9. Kang T.W., Yevesa T., Woller N., Hoenicke L., Wuestefeld T., Dauch D., Hohmeyer A., Gereke M., Rudalska R., Potapova A., Iken M., Vucur M., Weiss S., Heikenwalder M., Khan S., Gil J., Bruder D., Manns M., Schirmacher P., Tacke F., Ott M., Luedde T., Longerich T., Kubicka S., Zender L. Senescence surveillance of premalignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 2011. 9: 547.
10. Yevesa T., Kang T.W., Zender L. Immune surveillance of pre-cancerous senescent hepatocytes limits hepatocellular carcinoma development. *Oncoimmunology*. 2012. 1: 398.
11. Schneider C., Teufel A., Yevesa T., Staib F., Hohmeyer A., Walenda G., Zimmermann H.W., Vucur M., Huss S., Gassler N., Wasmuth H.E., Lira S.A., Zender L., Luedde T., Trautwein C., Tacke F. Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer. *Gut*. 2012. 61: 1733.
12. Reinhardt A., Yevesa T., Worbs T., Lienenklaus S., Sandrock I., Oberdorfer L., Korn T., Weiss S., Forster R., Prinz I. Interleukin-23-dependent γ/δ t cells produce interleukin-17 and accumulate in the entheses, aortic valve, and ciliary body in mice. *Arthritis Rheumatol*. 2016. 68(10): 2476.
13. Wolf B., Krieg K., Falk C., Breuhahn K., Keppeler H., Biedermann T., Schmid E., Warmann S., Fuchs J., Vetter S., Thiele D., Nieser M., Avci-Adali M., Skokowa Y., Schöls L., Hauser S., Ringelhahn M., Yevesa T., Heikenwalder M., Kossatz-Boehlert U. Inducing differentiation of premalignant hepatic cells as a novel therapeutic strategy in hepatocarcinoma. *Cancer Res*. 2016. 76(18): 5550.
14. Gorobets S.V, Gorobets O. Yu., Gorbyk P.P., Uvarova I.V. *Functional bio- and nanomaterials for medical purposes*. (Kiev: Condor, 2018). [in Ukrainian]
15. Uvarova I.V., Gorbyk P.P., Gorobets S.V., Ivashchenko O.A., Ulyanchenko N.V. *Medical nanomaterials*. (Kiev: Naukova Dumka, 2014). [in Ukrainian]
16. Roco M.C., Williams R.S., Alivisatos P. *Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade*. (Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2002).
17. Levy L., Sahoo Y., Earl B. J. Synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications. *Chem. Mater*. 2002. 14: 3715.
18. Gorbyk PP, Dubrovin IV, Petranovskaya AL, Turelik MP Magneto-controlled transport of drugs: the current state of development and prospects. *Surface*. 2010. 2(17): 287. [in Russian].
19. Gorbyk PP, Petranovskaya AL, Turelik MP, Abramov NV, Turanskaya SP, Pilipchuk EV, Chekhun VF, Lukyanova NY, Shpak AP, Korduban AM The problem of directed transport of

medicines: state and prospects. *Chemistry, physics and technology of the surface*. 2011. **2**(4): 433. [in Ukrainian].

20. Alyautdin R.N., Kroiter J., Kharkevich DA Delivery of drugs to the brain by nanoparticles. *Experim. and a wedge. pharmacology*. 2003. **66**(2): 65. [in Russian].

21. Gorbyk PP, Petranovskaya AL, Storozhuk LP and others. Magnetite Based Nanocomposites. *Ukr. chemical. J*. 2007. **73**(5): 24. [in Ukrainian].

22. Berezov T., Yaglova N., Dmitrieva T., etc. Directed transport of drugs with liposomes. *Vest. Ross. AMS*. 2004. 3: 42. [in Russian].

23. Bregadze V.I., Sivaev I.B. Sniper drug or chemical sight for a neutron. *Nature*. 2004. **4**: 1. [in Russian].

24. Grechko LG, Gorbyk PP, Lerman LB, Chuiko OO The possibility of using magnetic nanoparticles as a means of transport and retention of drugs in the target organ. *Add. NAS of Ukraine*. - 2006. **2**: 181. [in Ukrainian].

25. Gorbyk P.P., Dubrovin I.V., Petranovskaya A.L. etc. Magnetically sensitive drug carrier based on ultrafine magnetite polyacrylamide particles. *Add. NAS of Ukraine*. 2005. **4**: 224. [in Ukrainian].

26. Fedorenko O.M., Petranovskaya A.L., Dzubenko L.S., Gorbyk P.P. etc. Liquid-phase modification of the magnetite surface of γ -APS. *Add. NAS of Ukraine*. 2006. **1**: 157. [in Ukrainian].

27. Usov D.G., Petranovskaya A.L., Turelik M.P., Gorbik P.P. etc. Synthesis and physicochemical properties of nanocomposites based on magnetite modified with meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid. *Surface*. 2009: 320. [in Ukrainian].

28. Gorbyk P.P., Mishchenko V.M., Petranovskaya A.L. etc. Synthesis of magnetite / hydroxyapatite nanocomposites and investigation of their properties. *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies*. 2009. **6**(4): 1273. [in Ukrainian].

29. Shpak A., Gorbyk P. *Physico-chemistry of nanomaterials and supramolecular structures*. (Kiev: Naukova Dumka, 2007). [in Russian].

30. *Nanomaterials and Supramolecular Structures: physics chemistry and applications* / ed. by A. P. Shpak, P. P. Gorbyk. (Netherlands: Springer, 2009).

31. Gorbyk P.P. Nanocomposites with functions of medico-biological nanorobots: synthesis, properties, application. *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies*. 2013. **11**(2): 323. [in Ukrainian].

32. Patent UA 99211. Gorbik P.P., Petranovskaya A.L., Turelyk M.P. and others. Nanocapsule with functions of a nanorobot. 2012. [in Ukrainian].

33. Gorbyk P.P., Lerman L.B., Petranovska A.L., Turanska S.P. Magnetosensitive Nanocomposites with Functions of Medico-Biological Nanorobots: synthesis and properties. *Advances in Semiconductor Research: physics of nanosystems, spintronics and technological applications*. 2014: 161.

34. Gorbyk P.P., Lerman L.B., Petranovska A.L. et al. Magnetosensitive Nanocomposites with Hierarchical Nanoarchitecture as Biomedical Nanorobots: synthesis, properties and application. *Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials, Applications of Nanobiomaterials*. 2016: 289.

35. Abramov M.V., Kussyak A.P., Kaminskiy O.M., Turanska S.P., Petranovska A.L., Kussyak N.V., Gorbyk P.P. Magnetosensitive Nanocomposites Based on Cisplatin and Doxorubicin for Application in Oncology / Horizons in World Physics. – 2017. –P. 1–56.

36. Pylypchuk E., Kolodynska D., Gorbyk P.P. Gd(III) Adsorption on the DTPA-functionalized chitosan/magnetite nanocomposites. *Separation Science and Technology*. 2018. **53**(7): 1006.

37. Petranovska A.L., Abramov N.V., Turanska S.P., Gorbyk P.P., Kaminskiy A.N., Kussyak N.V. Adsorption of cis-dichlorodiammineplatinum by nanostructures based on single-domain magnetite. *J. Nanostruct. Chem.* 2015. 5: 275.
38. Abramov N.V., Turanska S.P., Kussyak A.P., Petranovska A.L., Gorbyk P.P. Synthesis and properties of magnetite/hydroxyapatite/doxorubicin nanocomposites and magnetic fluids based on them. *J. Nanostruct. Chem.* 2016. 6: 223.
39. Gorbyk P.P., Chekhun V. F. Nanocomposites of Medicobiologic Destination: reality and perspectives for oncology. *Funct. Mater.* 2012. 19(2): 145.
40. Pylypchuk I.V., Abramov M.V., Petranovska A. L., Turanska S. P., Budnyak T. M., Kussyak N.V., Gorbyk P.P. Multifunctional Magnetic Nanocomposites on the Base of Magnetite and Hydroxyapatite for Oncology Applications. *In book International Conference on Nanotechnology and Nanomaterials.* 2017: 35.
41. Gorbyk P.P., Makhno S.M., Dubrovin I.V. and others. Synthesis and properties of nanostructures absorbing ultra-high frequency electromagnetic and neutron radiation. *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies.* 2017. 15(1): 47. [in Ukrainian].
42. Gorbyk P.P., Abramov M.V., Dubrovin I.V. etc. Synthesis and properties of nanoscale single-domain spinel ferrites. *Uspekhi fiz. met.* 2017. 18(1): 59. [in Ukrainian].
43. Abramov M.V., Turanskaya S.P., Gorbyk P.P. Magnetic properties of super-paramagnetic kernel-shell nanocomposites. *Metallophys. the latest technol.* 2018. 40(4): 423. [in Ukrainian].
44. Abramov M.V., Turanskaya S.P., Gorbyk P.P. Magnetic properties of liquids based on polyfunctional nanocomposites such as superparamagnetic nucleus — multilevel shell. *Metallophys. the latest technol.* 2018. 40(10): 1283.
45. Internet resource: Antitumor nanocomposite "Ferroplat". Access point: <http://files.nas.gov.ua/NASDevelopmentsBook/PDF/0760.pdf>
46. Lukyanova N.Yu. Doctoral (Biol). Thesis. (Kiev, 2015). [in Ukrainian].
47. Patent UA 78473 Pyton B.E., Gorbik P.P., Petranovskaya A.L., Turelyk M.P., Abramov M.V., Vasilyeva O.A., Chekhun V.F., Lukyanov N.Yu. Magnetic antitumor fluid. 2013.
48. Patent UA 112490 Chekhun V.F., Luk'yanova N.Y., Gorbik P.P., Todor I.M., Petranovskaya A.L., Boshitskaya N.V., Bozhko I.V. Antitumor ferromagnetic nanocomposite. 2016.
49. Abramov M.V., Kussyak A.P., Kaminsky O.M., Turanskaya S.P., Petranovskaya A.L., Kussyak N.V., Turov V.V., Gorbik P.P. Synthesis and properties of magnetically sensitive polyfunctional nanocomposites for use in oncology. *Surface.* - 2017. 9(24): 165. [in Ukrainian].
50. Kusiak A.P., Turanskaya S.P., Nguyen M.H., Gorbyk P.P. Interaction of magnetically sensitive nanomaterials and nanocomposites with cells, viruses, bioactive molecules, heavy metal ions. *Surface.* 2017. 9(24): 211. [in Ukrainian].
51. Abramov M.V., Petranovskaya A.L., Pilipchuk E.V., Turanskaya S.P., Opanashchuk N.M., Kussyak N.V., Gorobets S.V., Gorbyk P.P. Magnetosensitive polyfunctional nanocomposites based on magnetite and hydroxyapatite for use in oncology. *Surface.* 2018. 10(25): 245. [in Ukrainian].
52. Arias J.L., Reddy L.H., Couvreur P. Fe₃O₄/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer. *J. Mater. Chem.* 2012. 22: 7622.
53. Popescu R.C., Andronescu E., Vasile B.S., Truscă R., Boldeiu A., Mogoantă L., Mogosanu G.D., Temelie M., Radu M., Grumezescu A. M., Savu D. Fabrication and Cytotoxicity of Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles. *Molecules.* 2017. 22(7): 1080.
54. Iglesias G.R., Reyes-Ortega F., Checa Fernandez B.L., Delgado Á.V. Hyperthermia-Triggered Gemcitabine Release from Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles. *Polymers.* 2018. 10(3): 269.

55. Patent UA 118524 Gorbyk P.P., Petranovska A.L., Abramov M.V., Turanskaya S.P., Pilipchuk E.V., Opanashchuk N.M., Kulish M.P., Dmitrenko O.P., Busko T.O., Pavlenko O.L., Gorobets S.V. Nanocomposite material. 2019
56. Meijia Wu, Shengwu Huang. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment (Review). *Molecular and clinical oncology*. 2017. **7**: 738.
57. Lazhen Shen, Bei Li, Yongsheng Qiao. Fe₃O₄ Nanoparticles in Targeted Drug/Gene Delivery Systems. *Materials*. 2018. **11**: 1.
58. Bae Y.B., Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J. Controll. Release*. 2011. **153**: 198.
59. Popescu R.C., Grumezescu A.M. Magnetite Nanostructures with Applications in Cancer Therapy. *Curr. Proteom*. 2014. **11**: 128.
60. Joubert F., Martin L., Perrier, S., Pasparakis G. Development of a gemcitabine-polymer conjugate with prolonged cytotoxicity against a pancreatic cancer cell line. *ACS Macro Lett*. 2017. **6**: 535.
61. Viota J.L., Carazo A., Munoz-Gamez J.A., Rudzka K., Gómez-Sotomayor R., Ruiz-Extremera A., Salmerón J., Delgado A.V. Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to tumor cells. Physicochemical in vitro evaluation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl*. 2013. **33**: 1183.
62. Li H., Ke F., An Y., Hou X., Zhang H., Lin M., Zhang D. Gemcitabine-loaded magnetic albumin nanospheres for cancer chemohyperthermia. *J. Nanopart. Res*. 2013. **15**:1513.
63. Wang L., An Y., Yuan C., Zhang H., Liang C., Ding F., Gao Q., Zhang D. GEM-loaded magnetic albumin nanospheres modified with cetuximab for simultaneous targeting, magnetic resonance imaging, and double-targeted thermochemotherapy of pancreatic cancer cells. *Int. J. Nanomed*. 2014. **10**: 2507.
64. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE trans. Magn*. 1981. **17**: 1247.
65. Mayti D., Agrawal D.C. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles under Oxidizing Environment and Their Stabilization in Aqueous and Non-Aqueous Media. *J. Magn. Magn. Mater*. 2007. **308**: 46.
66. Jiang W., Lai K.L., Hu H., Zeng X.-B., Lan F., Liu F., Liu K.-X., Wu Y., Gu Z.-W. The effect of [Fe³⁺]/[Fe²⁺] molar ratio and iron salts concentration on the properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the water/ethanol/toluene system. *J. Nanopart. Res*. 2011. **13**: 5135.
67. Malik M.A., Wani M.Y., Hashim M.A. Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. *Ist Nano Update. Arabian J. Chem*. 2012. **5**: 397.
68. Moore T.L., Rodriguez-Lorenzo L., Hirsch V., Balog S., Dominic Urban D., Jud C., Rothen-Rutishauser B., Lattuada M., Petri-Fink A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev*. 2015. **44**: 6287.
69. Ahlberg S., Antonopoulos A., Diendorf J., Dringen R., Epple M., Flöck R., Goedecke W., Graf C., Haberl N., Helmlinger J., et al. PVP-Coated, negatively charged silver nanoparticles. *J. Nanotechnol*. 2014. **5**: 1944.
70. Yu S.-M., Laromaine A., Roig A. Enhanced stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological media using a pH adjusted—BSA adsorption protocol. *J. Nanopart. Res*. 2014. **16**: 2484.
71. Wiogo H., Lim M., Bulmus V., Gutiérrez L., Woodward R.C., Amal R. Insight into Serum Protein Interactions with Functionalized Magnetic Nanoparticles in Biological Media. *Langmuir*. 2012. **28**: 4346.
72. Popescu R.C., Andronescu E., Grumezescu A.M. In vivo evaluation of Fe₃O₄ nanoparticles. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2014. **55**: 1013.

73. Mahdavi M., Ahmad M.B., Haron M.J., Namvar F., Nadi B., Rahman M.Z.A., Amin J. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Molecules*. 2013. **18**: 7533.

74. Chen D.Z., Tang Q.S., Li X.D., Zhou X.J., Zhang J., Xue W.Q., Xiang J.Y., Guo C.Q. Biocompatibility of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Int. J. Nanomed.* 2012. **7**: 4973.

75. Sabella S., Carney R.P., Brunetti V., Malvindi M.A., Al-Juffali N., Vecchio G., Janes S.M., Bakr O.M., Cingolani R., Stellacci F., et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*. 2014. **6**: 7052.

76. Cottin S., Ghani K., de Campos-Lima P.O., Caruso M. Gemcitabine intercellular diffusion mediated by gap junctions: New implications for cancer therapy. *Mol. Cancer*. 2010. **9**: 141.

77. Quinto C.A., Mohindra P., Tong S., Bao G. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. *Nanoscale*. 2015. **7**: 12728.

78. Schlorf T., Meincke M., Kossel E., Glueer C.C., Jansen O., Mentlein R. Biological Properties of Iron Oxide Nanoparticles for Cellular and Molecular Magnetic Resonance Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* 2011. **12**: 12.

79. Singh R., Shakya A.K., Naik R., Shalan N. Stability-Indicating HPLC Determination of Gemcitabine in Pharmaceutical Formulations. *Int. J. Anal. Chem.* 2015: 862592.

80. Parsian M., Unsoy G., Mutlu P., Yalcin S., Tezcaner A., Gunduz U. Loading of Gemcitabine on chitosan magnetic nanoparticles increases the anti-cancer efficacy of the drug. *Eur. J. Pharmacol.* 2016. **784**: 121.

81. Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* 2010. **67**: 217.

82. Jaidev L.R., Krishnan U.M., Sethuraman S. Gemcitabine loaded biodegradable PLGA nanospheres for in vitro pancreatic cancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2015. **47**: 40.

83. Cherie Ann Kruger, Heidi Abrahamse. Utilisation of Targeted Nanoparticle Photosensitiser Drug Delivery Systems for the Enhancement of Photodynamic Therapy. *Molecules*. 2018. **23**: 1.

84. Qingxin Mu, Guanyou Lin, Victoria K. Patton, Kui Wang, Oliver W. Press, Miqin Zhang. Gemcitabine and chlorotoxin conjugated iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy. *Journal of Materials Chemistry*. 2016.

85. Petranovska A.L., Abramov M.V., Opanashchuk N.M., Turanska S.P., Kussyak N.V., Gorbyk P.P. Synthesis and properties of magnetically sensitive nanocomposites based on magnetite and gemcitabine. *Chemistry, Physics and Technology of Surface*. 2018. **9**(4): 353.

86. Petranovskaya A.L., Abramov M.V., Opanashuk N.M., Pavlovskaya A.F., Kussyak N.V., Gorbik P.P., Lukyanova N.Y., Chekhun V.F. Synthesis of magnetic fluids based on magnetite, gemcitabine and CD340 antibodies and study of their properties. *Materials of Conf. "Modern Materials Science: Physics, Chemistry, Technology"* 2019: 201.

87. Opanaschuk N.M., Petranovska A.L., Gorbyk P.P., Kussyak N.V., Lukianova N.Y., Chekhun V.F. The investigation into a cytotoxic action of vector magnetic liquids with adsorbed gemcitabine in vitro. *Ukrainian Conference with International Participation Chemistry, physics and technology of surface and workshop metal-based biocompatible nanoparticles: Synthesis And Applications. Book of abstracts.* 2019: 133.

88. Freshne R.Ya. *Animal cell culture: a practical* (Moscow: BINOM. Laboratory of Knowledge, 2010). [in Russian].

89. Zelentsov V.I., Datsko T.Ya. Application of adsorption models for the description of equilibrium in an aluminum oxyhydroxide system – fluorine. *Electronic material processing*. 2012. **48**(6): 65. [in Russian].

90. Chen D.-X., Sun N., Gu H.-C. Size analysis of carboxydextran coated superparamagnetic iron oxide particles used as contrast agent of magnetic resonance imaging. *J. App. Phys.* 2009. **106**(6): 63906.

91. Petranovska A.L., Abramov M.V., Opanashchuk N.M., Kussyak N.V., Kussyak A.P., Turanska S.P., Gorobets S.V., Gorbyk P.P., Lukianova N.Yu., Chekhun V.F. Magnetically sensitive nanocomposites and magnetic fluids based on magnetite, gemcitabine and HER2 antibody. *Ukrainian Conference with International Participation Chemistry, physics and technology of surface and workshop metal-based biocompatible nanoparticles: synthesis and applications. Book of abstracts.* 2019: 134.

92. Gianfranco Pasut, Fabiana Canal, Lisa Dalla Via, Silvia Arpicco, Francesco M. Veronese, Oddone Schiavon. Antitumoral activity of PEG – gemcitabine prodrugs targeted by folic acid. *Journal of Controlled Release.* 2008: 239.

93. Shmeeda H., Mak L., Tzemach D., Astrahan P., Tarshish M., Gabizon A. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol. Cancer Ther.* 2006. **5**(4): 818.

94. Chitta Ranjan Patra, Resham Bhattacharya, Enfeng Wang, Aaron Katarya, Julie S. Lau, Shamit Dutta, Michael Muders, Shanfeng Wang, Sarah A. Buhrow, Stephanie L. Safgren, Michael J. Yaszemski, Joel M. Reid, Matthew M. Ames, Priyabrata Mukherjee, Debabrata Mukhopadhyay. Targeted Delivery of Gemcitabine to Pancreatic Adenocarcinoma Using Cetuximab as a Targeting Agent. *Cancer Res.* 2008. **6**: 68.

95. Wei-Ting Kuo, Jian-Yuan Huang, Min-Hua Chen, Ching-Yun Chen, Yan-Jye Shyong, Ko-Chung Yen, Yu-Jun Sun, Cherng-Jyh Ke, Yung-Hsin Cheng, Feng-Huei Lin. Development of gelatin nanoparticles conjugated with phytohemagglutinin erythroagglutinating loaded with gemcitabine for inducing apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *J. Mater. Chem.* 2016.

96. Atyabi F., Hosseinzadeh H., Dinarvand R., Ostad S. Preparation and characterization of gemcitabine nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences.* 2012. **7**(5): 236

97. Caixia Wang, Yuanqiang Zheng, Michael A. Sandoval, Solange A. Valdes, Zhe Chen, Dharmika S. Lansakara-P, Maolin Du, Yanchun Shi, Zhengrong Cui. Oral 4-(N)-stearoyl gemcitabine nanoparticles inhibit tumor growth in mouse models. *Oncotarget.* 2017. **8**(52): 89876.

98. Zhongyi Guo, Feng Wang, Yang Di, Lie Yao, Xinzhe Yu, Deliang Fu, Ji Li, Chen Jin. Antitumor effect of gemcitabine-loaded albumin nanoparticle on gemcitabine-resistant pancreatic cancer induced by low hENT1 expression. *Int J Nanomedicine.* 2018. **13**: 4869.

99. Xiao J , Yu H. Gemcitabine Conjugated Chitosan and Double Antibodies (Abc-GC-Gemcitabine Nanoparticles) Enhanced Cytoplasmic Uptake of Gemcitabine and Inhibit Proliferation and Metastasis In Human SW1990 Pancreatic Cancer Cells. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.* 2017. **23**: 1613.

100. Zhang R, Ru Y, Gao Y, Li J, Mao S. Layer-by-layer nanoparticles co-loading gemcitabine and platinum (IV) prodrugs for synergistic combination therapy of lung cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2017. **11**: 2631.

101. Laurent Louis, Ghyselen Bruno, Fermon Claude and other Nanosciences and Nanotechnology: Evolution or Revolution? – Springer, 2016: 438. ISBN-13: 978-3319193595

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В ОНКОТЕРАПИИ НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ГЕМЦИТАБИНА

С.П. Туранская, Н.М. Опанащук, А.Л. Петрановская, Н.В. Кусяк, Б.И. Тарасюк*,
С.В. Горобец*, В.В. Туров, П.П. Горбик, Н.В. Абрамов

*Институт химии поверхности имени А.А. Чуйко НАН Украины, ул. Генерала Наумова, 17,
Киев 03164, Украина, e-mail: phorbyk@ukr.net*

**Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический
институт имени Игоря Сикорского», просп. Победы, 37, 03056, Киев Украина*

Целью работы является обзор научных трудов, посвященных синтезу, исследованию свойств и применению в медицине, в частности онкотерапии, наноконпозитов на основе гемцитабина (ГЦ), перспективных для использования в методе адресной доставки.

Общепризнанной альтернативой традиционной химиотерапии ГЦ является использование методов адресной доставки, позволяющий создать терапевтическую дозу лекарственного препарата в очаге заболевания, осуществить терапию при значительно меньшей его общей дозе и минимизировать токсико-аллергические реакции организма пациентов. Среди многообразия современных методов адресной доставки лекарственных препаратов и локальной терапии заболеваний на уровне органов, клеток и генов, наивысшего развития в настоящее время получили методы с применением магниточувствительных наноструктур, конъюгированных с противоопухолевыми средствами различного механизма действия.

В настоящее время обоснована концепция химического конструирования магниточувствительных наноконпозитов (НК) с многоуровневой иерархической наноархитектурой, что характеризуются функциями "наноклиник" и медико-биологических нанороботов: распознавание микробиологических объектов в биологических средах; целевой доставки лекарственных препаратов в клетки и органы-мишени и депонирование; комплексной локальной химио-, иммуно-, нейтронзахлопывальной, гипертермической, фотодинамической терапии и магнитно-резонансной томографической диагностики в режиме реального времени, детоксикации организма путем адсорбции остатков клеточного распада, вирусных частиц, ионов тяжелых металлов и т.д. и их удаление с помощью магнитного поля.

Для изготовления магниточувствительных полифункциональных НК значительный интерес исследователей вызывают наноструктуры типа ядро-оболочка на основе однодоменных магнетита (Fe_3O_4), которые характеризуются уникальным комплексом физических, химических и биологических свойств, возможностью создания на их основе магнитных жидкостей (МЖ), содержащие онкологические лекарственные средства различного функционального назначения и механизмов действия.

Показано, что одна из основных проблем современной противоопухолевой терапии гемцитабином заключается в токсичности и слабой биодоступности препарата. В последние годы значительно возрос интерес к использованию природных механизмов эндоцитоза и различного типа наноструктур для доставки лекарственных препаратов к опухолям, с привлечением лигандов, таких как гормоны, витамины и факторы роста, направленных против ассоциированных с опухолями рецепторов, которые избыточно представлены на поверхности опухолевых клеток и имеют ограниченное распределение в нормальных тканях. В настоящее время методами современной нанотехнологии активно разрабатываются магниточувствительные и немагнитные конъюгаты для доставки ГЦ

мишень-направленным способом до злокачественных клеток, что позволит уменьшить его системную токсичность. Преимуществом, которое оказывает применение конъюгации лекарственного препарата на поверхности наночастиц для доставки лекарственных средств *in vivo*, является медленное высвобождение препарата, потенциально обеспечивает более длительное присутствие лекарственного средства в потоке крови на необходимом уровне. Положительным результатом использования гипертермии в сочетании с высвобождением лекарств может быть улучшение состояния пациента и уменьшение частоты приема лекарств.

Несмотря на значительное количество успешных исследований по применению магнитных наночастиц как тераностического материала, а также многократные успешные результаты на малых животных моделях, до сих пор они не удовлетворяют клинические потребности. Однако, при достижении высокой емкости по отношению к лекарственному препарату, увеличении специфичности и сродства к опухолевым клеткам, сочетании томографии и мультимодальной локальной терапии, магнитные наночастицы могут стать удобными для клинического использования в ближайшем будущем и значительно повлиять на эффективность лечения онкологических заболеваний.

Ключевые слова: магнетит, нанокompозиты, гемцитабин, адсорбция, высвобождение.

SYNTHESIS, PROPERTIES AND APPLICATION OF NANOCOMPOSITES BASED ON GEMCITABINE IN ONCOTHERAPY

**S.P. Turanska, N.M. Opanashchuk, A.L. Petranovska, N.V. Kusyak, B.I. Tarasiuk*,
S.V. Gorobets*, V.V. Turov, P.P. Gorbyk, M.V. Abramov**

Chuiko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine,

17 General Naumov Str., Kyiv 03164, Ukraine, e-mail: phorbyk@ukr.net

**National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnical Institute",
37 Prospekt Peremogy, Kyiv 03056, Ukraine*

The aim of the work is to review scientific papers on the synthesis, study of properties and application of nanocomposites based on gemcitabine, promising for use in the targeted delivery method, in medicine, in particular oncotherapy.

A generally recognized alternative to traditional chemotherapy with gemcitabine (GC) is the use of targeted delivery methods that allow one to create a therapeutic dose of the drug in a disease nidus, to carry out therapy at a much lower its total dose and minimize toxic-allergic reactions in patients. Currently, among the variety of modern methods of targeted drug delivery and local treatment of diseases at the level of organs, cells and genes, the methods have received the highest development using magnetosensitive nanostructures conjugated with antitumor agents of various mechanisms of action.

Currently, the concept has been substantiated for chemical construction of magnetically sensitive nanocomposites (NC) with a multi-level hierarchical nanoarchitecture, which are characterized by the functions of "nanoclinics" and biomedical nanorobots: recognition of microbiological objects in biological environments; targeted drug delivery to specific cells and organs, and deposition; complex local chemo-, immuno-, neutron capture, hyperthermic, photodynamic therapy and magnetic resonance imaging diagnostics in real-time regime,

detoxification of an organism by adsorption of cellular decomposition residues, viral particles, heavy metal ions, etc. and their removal using a magnetic field.

For the manufacture of magnetically sensitive multifunctional NC, a considerable interest of researchers is drawn by core-shell type nanostructures based on single-domain magnetite (Fe_3O_4), which are characterized by a unique complex of physical, chemical and biological properties, the possibility to create magnetic liquids based on them, containing oncological remedies of various functional purpose and mechanisms of action.

It has been shown that one of the main problems of modern antitumor therapy with gemcitabine is the toxicity and poor bioavailability of the drug. In recent years, an interest has been significantly increased to use the natural mechanisms of endocytosis and various types of nanostructures for delivering of drugs to tumors, involving ligands such as hormones, vitamins, and growth factors directed against tumor-associated receptors that are excessively present on the surface of tumor cells and have a limited distribution in normal tissues. Currently, using methods of modern nanotechnology, magnetically sensitive and non-magnetic conjugates are actively developed for targeted delivery of GC to malignant cells, which will reduce its systemic toxicity. The advantage gained by the drug conjugation on the surface of nanoparticles for drug delivery in vivo is the slow release of the drug, potentially providing a longer presence of the drug in the blood stream at the required level. A positive result of the use of hyperthermia in combination with the release of drugs can be an improvement in the patient's condition and a decrease in the frequency of drug administration.

Despite a significant number of successful studies on the use of magnetic nanoparticles as a theranostic material, as well as repeated successful results in small animal models, they still do not satisfy clinical needs. However, upon reaching a high capacity in relation to the drug, increasing specificity and affinity for tumor cells, in a combination of imaging and multimodal local therapy, magnetic nanoparticles may become convenient for clinical use in the near future and significantly affect the effectiveness of cancer treatment.

Key words: *magnetite, nanocomposites, gemcitabine, adsorption, release.*