ISSN 2079-1704. Хімія, фізика та технологія поверхні. 2016. Т. 7. № 2. С. 236-245

УДК 539.211:544.723 doi: 10.15407/hftp07.02.236

С.П. Туранська [1], А.П. Кусяк [1], А.Л. Петрановська [1], С.В. Горобець [2], В.В. Туров [1], П.П. Горбик [1]

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

[1] Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, E-mail: sturanska@ukr.net
[2] Національний технічний університет України «КПІ»
проспект Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

Синтезовано нові магніточутливі нанокомпозити, що містять сучасний протипухлинний препарат доксорубіцин. Досліджено їх біосумісність та біоактивність. Зокрема, встановлено, що в кількостях 0.6–0.8 мг доксорубіцину/зразок нанокомпозити виявляють цитотоксичну і антипроліферативну дію по відношенню до модельних клітин Saccharomyces cerevisiae. Показана перспективність використання цих нанокомпозитів в онкології.

Ключові слова: *нанорозмірний однодоменний магнетит, нанокомпозити Fe_3O_4/доксорубіцин, Fe_3O_4/SiO_2/доксорубіцин, Fe_3O_4/TiO_2/доксорубіцин, Fe_3O_4/гідроксіапатит/доксорубіцин, доксорубіцин, дріжджові клітини, цитотоксичність, проліферація*

ВСТУП

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

В роботах [16–18] досліджено взаємодію доксорубіцину з клітинами хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, зокрема, наявність цитотоксичного впливу антибіотика на клітини [16, 17] та зниження швидкості їх проліферації [18]. Вказані ефекти є характерними для доксорубіцину та обумовлені, зокрема, його участю в редокс-циклічних реакціях та відповідним збільшенням кількості вільних радикалів, індукуванням оксидативного стресу, затримками клітинного циклу в G_1- та S-фазах. Однак нам не вдалося відшукати в наукових джерелах даних стосовно впливу магніточутливих нанокомпозитів, що містили доксорубіцин, на клітини хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

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

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для досліджень синтезували нанокомпозити Fe_3O_4/доксорубіцин (ДР), Fe_3O_4/SiO_2/ДР, Fe_3O_4/TiO_2/ДР, Fe_3O_4/гідроксі-апатит (ГА)/ДР.

© С.П. Туранська, А.П. Кусяк, А.Л. Петрановська, С.В. Горобець, В.В. Туров, П.П. Горбик, 2016

Синтез нанорозмірного однодоменного магнетиту та модифікування його гідроксіапатитом. Нанодисперсний однодоменний магнетит синтезували за реакцією Елмора. Для досліджень використовували фракцію частинок розміром 6–23 нм, які є однодоменними. Питома поверхня дослідних зразків становила S = 105–180 м^2/г. Модифікування поверхні нанорозмірного магнетиту ГА (одержання композитів Fe_3O_4/ГА) здійснювали за реакцією:

$$10\ Ca(NO_3)_2 + 6\ (NH_4)_2HPO_4 + 8\ NH_4OH \rightarrow$$
$$\rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20\ NH_4NO_3.$$

Згідно даних рентгенівської фотоелектронної спектроскопії величина співвідношення Ca/P в поверхневому шарі синтезованих зразків відповідає стехіометрії ГА (Ca/P = 1.67). Більш детально методику синтезу однодоменного Fe_3O_4, нанокомпозитів Fe_3O_4/ГА, адсорбційної іммобілізації доксо-рубіцину на поверхні наноструктур, отримання нанокомпозитів Fe_3O_4/доксорубіцин, Fe_3O_4/ГА/ДР та їх властивості наведено в [19].

Модифікування магнетиту тетраетоксисиланом. Одержання нанокомпозитів Fe_3O_4/SiO_2. Для одержання нанокомпозитів Fe_3O_4/SiO_2 як модифікуючий агент обрано тетраетоксисилан (ТЕОС) [20]. Методика синтезу нанокомпозитів на основі магнетиту, модифікованого діоксидом кремнію, ґрунтується на використанні процесів гідролізу ТЕОС. Вміст покриття складав 0.2 г SiO_2 на 1 г магнетиту.

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

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

Приєднання модифікатора відбувається в результаті утворення водневих зв'язків між силанольною групою і гідроксильною групою поверхні магнетиту з подальшою поліконденсацією і утворенням силоксанового покриття.

За результатами модифікування питома поверхня нанокомпозиту збільшується від 105 м^2/г (для немодифікованого магнетиту) до 130 м^2/г.

Модифікування поверхні магнетиту виконували методом адсорбційного модифікування поверхні за методикою [23]. Готували 20 %-й розчин ТЕОС: 7.5 мл ТЕОС + 5 мл H_2O при безперервному перемішуванні. При розшаруванні (≈ через 20 хв після початку перемішування) додавали 20 мл етанолу. Перемішували протягом 2 год. Знову додавали 9 мл спирту. До зволоженого магнетиту додавали одержаний реагент. Диспергували ультразвуком протягом 10 хв.

Модифікування поверхні частинок магнетиту тетрабутоксититаном. Одержання нанокомпозитів Fe_3O_4/TiO_2. Для одержання нанокомпозитів Fe_3O_4/TiO_2 як модифікуючий агент використовували *н*-бутилортотитанат [20]. Запропонована методика базується на реакції перетворення *н*-бутилортотитанату на поверхні магнетиту в TiO_2. Це перетворення складається з таких процесів: гідролізу *н*-бутилортотитанату; наступної конденсації продуктів гідролізу з утворенням полімерів; руйнування полімера при підвищенні температури з утворенням аморфного TiO_2.

Процеси гідролізу алкілортотитанатів та їх полімеризації описані в [23]. Слід зазначити, що реакція гідролізу проходить достатньо швидко. Ступінь полімеризації і будова полімерів у значній мірі залежить від співвідношення ортотитанату та води, яка потрібна для досягнення бажаного ступеня гідролізу, умов проведення гідролізу, каталізаторів тощо.

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

Іммобілізація доксорубіцину. Іммобілізацію ДР на поверхнях магнетиту Fe_3O_4 та наноструктур Fe_3O_4/SiO_2, Fe_3O_4/TiO_2,

Fe_3O_4/ГА здійснювали адсорбційним методом із середовища фізіологічного розчину. Особливості експериментальних методик адсорбційної іммобілізації доксорубіцину на поверхні наноструктур, отримання нанокомпозитів Fe_3O_4/доксорубіцин, Fe_3O_4/ГА/ДР та їх властивості наведено в [19].

Дослідження біоактивності та біосумісності нанокомпозитів. Біоактивність та біосумісність нанокомпозитів визначали за життєздатністю дріжджових клітин цитохімічним методом із застосуванням методу оптичної мікроскопії (біологічний мікроскоп типу Bresser Erudit MO 20x-1536x) та барвника метиленового синього [24, 25] шляхом реєстрації зміни їх концентрації в суспензіях, що містили вказані нанокомпозити, клітини дріжджів, мінімальне синтетичне живильне середовище (МСЖС) [18] та фізіологічний розчин. Чисельно життєздатність (L) оцінювали за формулою:

$$L = M_1/(M_1 + M_2)\cdot 100\ \%,$$

де M_1 – кількість живих клітин, M_2 – кількість загиблих клітин. Отримані дані порівнювали з результатами досліджень контрольних зразків (серії 1, 2).

Загалом досліджено зразки таких серій:

1 – суспензія дріжджових клітин (початкова концентрація $n_0 \approx 2.5\cdot10^7$ мл$^{-1}$) у фізіологічному розчині з МСЖС;

2 – суспензія фізіологічного розчину та вихідного нанорозмірного однодоменного магнетиту (170 мкг/мл), що містила клітини дріжджів ($n_0 \approx 2.5\cdot10^7$ мл$^{-1}$) та МСЖС;

3 – суспензія дріжджових клітин ($n_0 \approx 2.5\cdot10^7$ мл$^{-1}$) у фізіологічному розчині, що містила МСЖС та нанокомпозити Fe_3O_4/ДР (маса іммобілізованого доксорубіцину в зразку ($M_{ДР}$) становила 0.7 мг) ;

4 – суспензія фізіологічного розчину та нанокомпозитів Fe_3O_4/ГА/ДР ($M_{ДР} = 0.6$ мг) з клітинами дріжджів ($n_0 \approx 3.5\cdot10^7$ мл$^{-1}$) та МСЖС;

5 – суспензія фізіологічного розчину та нанокомпозитів Fe_3O_4/SiO_2/ДР ($M_{ДР} = 0.7$ мг) з клітинами дріжджів ($n_0 \approx 2.5\cdot10^7$ мл$^{-1}$) та МСЖС;

6 – суспензія фізіологічного розчину та нанокомпозитів Fe_3O_4/TiO_2/ДР ($M_{ДР} = 0.8$ мг) з клітинами дріжджів ($n_0 \approx 3\cdot10^7$ мл$^{-1}$) та МСЖС.

Всі досліджені зразки містили 1.3 мл фізіологічного розчину (0.9 % NaCl) та 1 мл мінімального синтетичного середовища як живильної речовини. Маса клітин дріжджів становила 0.5 мг (аналітичні ваги ВЛА-200). Наночастинки магнетиту, нанокомпозити та клітини дріжджів у суспензіях відповідних серій зразків приводили в контакт струшуванням.

Кількість клітин для кожного із зразків відповідних серій підраховували методом світлової мікроскопії із застосуванням камери Горяєва після початку досліду, через 16 год та через 3.5 доби. Досліджували по три зразки кожної серії, для отримання статистично достовірних результатів підрахунок кількості клітин проводили у 5–7 великих квадратах камери, результати усереднювали.

Концентрацію клітин (n, мл$^{-1}$) підраховували за формулою: $n = N\cdot2.5\cdot10^5$, де N – кількість клітин над великим квадратом камери Горяєва.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

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

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

При дослідженні біоактивності доксорубіцину було експериментально встановлено, що його розчин у фізіологічній рідині призводить до майже повної загибелі клітин дріжджів (95 %) в концентрації 0.5 мг/мл за 3.5 доби. В методиці на визначення цитотоксичності прийнято [26] користуватись дозою IC_{50}, за якої спостерігається загибель 50 % клітин. Тому для тестування біоактивності кількість нанокомпозитного матеріалу (~20 мг) з іммобілізованим доксорубіцином (~50 мг/г), який використовувався для утворення суспензії, вибиралась з розрахунку, щоб концентрація вивільненого ДР у дослідних суспензіях становила ~0.25 мг/мл.

Аналіз даних досліджень (рис. 1) свідчить, що в суспензіях клітин дріжджів ($n_0 \approx 2.5 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$) у фізіологічному розчині з поживною речовиною (контролі типу 1) спостерігається виражене збільшення їх кількості [27], яке призводило до зростання їх концентрації удвічі через 16 год ($5 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$). У подальшому швидкість поділу клітин сповільнювалась (можливо, через зменшення поживної речовини), однак через 3.5 доби їх концентрація сягала ~10^8 мл$^{-1}$. Життєздатність дріжджових клітин в експериментах серії 1 суттєво не змінювалась і становила ~98–99 %.

Аналіз даних досліджень, наведених на рис. 2, свідчить, що в суспензії фізіологічного розчину та вихідного нанорозмірного однодоменного магнетиту (170 мкг/мл), яка містила клітини дріжджів ($n_0 \approx 2.5 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$) та поживну речовину (контролі типу 2), також спостерігається досить активний поділ, внаслідок якого концентрація клітин через 16 год становила ~$6.5 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$, а через 3.5 доби перевершувала 10^8 мл$^{-1}$. Життєздатність клітин дріжджів, як і в попередньому випадку, на всіх стадіях досліджень зразків серії 2 становила ~98–99 %. Наведені дані свідчать про біосумісність нанорозмірного однодоменного магнетиту по відношенню до клітин дріжджів в умовах експерименту. Деяке перевищення швидкості клітинної проліферації в зразках серії 2 порівняно з попереднім випадком може бути пояснено ефектом малих доз [28], який полягає в стимулюванні життєдіяльності клітин внаслідок адсорбції продуктів метаболізму поверхнею магнетиту.

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

Результати досліджень свідчать (рис. 3), що наявність нанокомпозитів Fe_3O_4/ДР (кількість іммобілізованого ДР в зразку 0.7 мг) у суспензіях дріжджових клітин ($n_0 \approx 2.5 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$) у фізіологічному розчині з поживною речовиною (серія 3) призводить до істотного пригнічення клітинної проліферації. Так, через 16 год концентрація клітин дріжджів практично не змінилася, лише через 3.5 доби їх кількість дещо зросла і становила ~$3 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$.

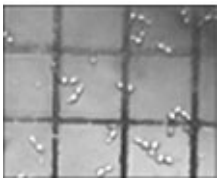
Дослідженнями взаємодії суспензії фізіологічного розчину зразків серії 4, нанокомпозитів Fe_3O_4/ГА/ДР (вміст ДР 0.6 мг), з клітинами дріжджів (рис. 4) також встановлено істотнє пригнічення клітинної проліферації. Концентрація клітин дріжджів на початку експерименту становила ~$3.5 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$ і практично не змінилася за 16 год, лише через 3.5 доби їх кількість зросла до ~$4 \cdot 10^7$ мл$^{-1}$.

Подібне пригнічення проліферації клітин дріжджів спостерігалося також при їх взаємодії з нанокомпозитами Fe_3O_4/SiO_2/ДР (вміст ДР 0.7 мг) та Fe_3O_4/TiO_2/ДР (вміст ДР 0.8 мг) у дослідах із зразками серій 5 та 6, відповідно. Зазначимо лише, що у випадку нанокомпозитів Fe_3O_4/SiO_2/ДР зростання кількості клітин дріжджів не спостерігалось навіть через 3.5 доби. Цей факт звертає на себе увагу, оскільки в роботі [29] повідомлялось про можливість синергічного впливу антибіотика на метаболізм клітин у присутності високодисперсного кремнезему. Вказаний синергізм може бути обумовлений утворенням на поверхні нанорозмірного SiO_2 кластерів молекул H_2O, які розпізнаються клітинами, внаслідок чого нанокомпозити Fe_3O_4/SiO_2/ДР можуть мати кращу біодоступність і, відповідно, вищу біоактивність [30, 31].

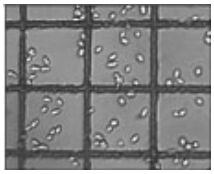
Характерним для дослідів із зразками серій 3–6 було також те, що життєздатність дріжджових клітин з часом зменшувалась і складала ~85 та 75 %, відповідно, через 16 год та 3.5 доби. Слід також зазначити, що при цьому спостерігалося зростання кількості значно збільшених клітин (аж до подвоєння розміру) видовженої форми, що не змогли поділитися, що свідчить про значні порушення клітинного циклу.

Наведені дані свідчать, що магніточутливі нанокомпозити Fe_3O_4/ДР, Fe_3O_4/SiO_2/ДР, Fe_3O_4/TiO_2/ДР, Fe_3O_4/ГА/ДР виявляють цитотоксичну та протипроліферативну активність по відношенню до клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae,* механізм якої є характерним для антибіотика антрациклінового ряду доксорубіцин.

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

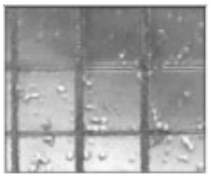


а

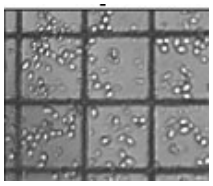


б

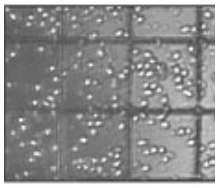
Рис. 1. Зміна кількості клітин дріжджів в контрольній серії 1: *а* – на початку досліджень, *б* – через 16 год



а

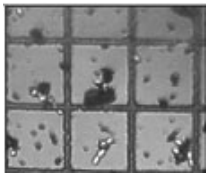


б

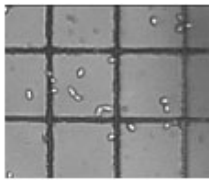


в

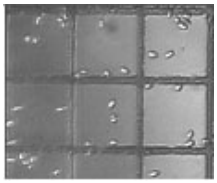
Рис. 2. Зміна кількості клітин дріжджів в контрольній серії 2 (фізрозчин, клітини дріжджів, МСЖС, магнетит): *а* – на початку, *б* – через 16 год, *в* – через 3.5 доби



а

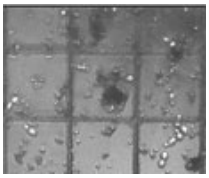


б

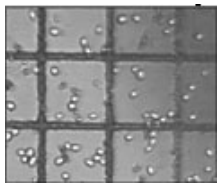


в

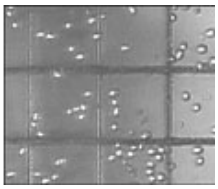
Рис. 3. Взаємодія нанокомпозитів Fe_3O_4/ДР з клітинами дріжджів (серія 3): *а* – на початку, *б* – через 16 год, *в* – через 3.5 доби



а

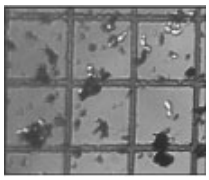


б

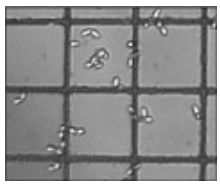


в

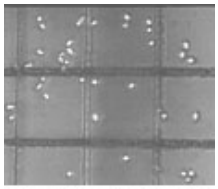
Рис. 4. Взаємодія нанокомпозитів Fe_3O_4/ГА/ДР з клітинами дріжджів (серія 4): *а* – на початку, *б* – через 16 год, *в* – через 3.5 доби



а

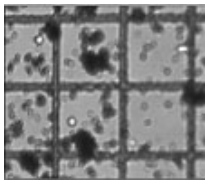


б

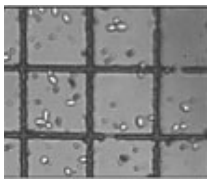


в

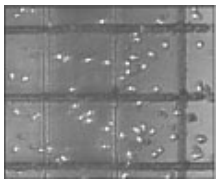
Рис. 5. Взаємодія нанокомпозитів Fe_3O_4/SiO_2/ДР з клітинами дріжджів (серія 5): *а* – на початку, *б* – через 16 год, *в* – 3.5 доби



а



б



в

Рис. 6. Взаємодія нанокомпозитів Fe_3O_4/TiO_2/ДР з клітинами дріжджів (серія 6): *а* – на початку, *б* – через 16 год, *в* – 3.5 доби

ВИСНОВКИ

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

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

Цитотоксическая активность магнитоуправляемых нанокомпозитов на основе доксорубицина на примере клеток *Saccharomyces cerevisiae*

С.П. Туранская [1], А.П. Кусяк [1], А.Л. Петрановская [1], С.В. Горобец [2], В.В. Туров [1], П.П. Горбик [1]

[1]Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, sturanska@ukr.net
[2]Национальный технический университет Украины «КПИ»
проспект Победы, 37, Киев, 03056, Украина

Синтезированы новые магниточувствительные нанокомпозиты, содержащие современный противоопухолевый препарат доксорубицин. Исследована их биосовместимость и биоактивность. В частности, выяснено, что в количествах 0.6–0.8 мг доксорубицина/образец нанокомпозиты оказывают цитотоксическое и антипролиферативное воздействие по отношению к модельным клеткам Saccharomyces cerevisiae. Показана перспективность использования этих нанокомпозитов в онкологии.

Ключевые слова: *наноразмерный однодоменный магнетит, нанокомпозиты Fe_3O_4/доксорубицин, Fe_3O_4/SiO_2/доксорубицин, Fe_3O_4/TiO_2/доксорубицин, Fe_3O_4/гидроксиапатит/доксорубицин, доксорубицин, дрожжевые клетки, цитотоксичность, пролиферация*

Cytotoxic activity of magnet-quided doxorubicin-based nanocomposites with *Saccharomyces cerevisiae* cells as an example

S.P. Turanska [1], A.P. Kusyak [1], A.L. Petranovska [1], S.V. Gorobez' [2], V.V. Turov [1], P.P. Gorbyk [1]

[1]Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, sturanska@ukr.net
[2]National Technical University of Ukraine «KPI»
37 Peremogy Pr., Kyiv, 03056, Ukraine

The aim of the work is investigation of cytotoxic influence of the magnetocarried polyfunctional nanocomposites based on single-domain magnetite (Fe_3O_4) and anthracycline antibiotic doxorubicin (DOX) on yeast cells Saccharomyces cerevisiae. Magnetite was synthesized according to the Elmor reaction. For investigations we used a fraction of particles with sizes of 6-23 nm. Specific surface area of the samples studied was S = 105–180 m^2/g. Magnetosensitive nanocomposites Fe_3O_4/DOX, Fe_3O_4/SiO_2/DOX, Fe_3O_4/TiO_2/DOX, Fe_3O_4/ hydroxyapatite (HA)/DOX were synthesized. To obtain Fe_3O_4/SiO_2 nanocomposites, we used tetraethoxysilane (TEOS) as a modifying agent. The technique for synthesis of

nanocomposites consisting of magnetite modified with silica dioxide involves hydrolysis of TEOS. The coating was 0.2 g of SiO_2 on 1 g of magnetite. Specific surface area of the nanocomposite increases from 105 m^2/g (for unmodified magnetite) to 130 m^2/g. To obtain Fe_3O_4/TiO_2 nanocomposites, we used n-butylorthotitanate as a modifying agent. The technique based on the reaction of conversion of n-butylorthotitanate on the magnetite surface into TiO_2. This conversion consists in hydrolysis of n-butylorthotitanate followed by condensation of hydrolysis products with formation of amorphous TiO_2. Modification of the surface of nanosized magnetite with hydroxyapatite (obtaining of Fe_3O_4/HA composites) was carried out by the reaction: $10\,Ca(NO_3)_2 + 6\,(NH_4)_2HPO_4 + 8\,NH_4OH \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20\,NH_4NO_3$. We realized immobilization of DOX on the surfaces of magnetite Fe_3O_4 and nanostructures Fe_3O_4/SiO_2, Fe_3O_4/TiO_2, Fe_3O_4/HA by adsorption method from saline environment. Bioactivity of the nanocomposites was determined in the study of viability of cells by a cytochemical method using optical microscopy and Goryaev chamber with registration of concentration change for cells in suspensions containing nanocomposites, yeast cells, minimal synthetic nutrient medium and saline. Fe_3O_4/DOX, $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$, $Fe_3O_4/TiO_2/DOX$, $Fe_3O_4/HA/DOX$ nanocomposites had cytotoxic and antiproliferative activity with respect to Saccharomyces cerevisiae cells, which were characteristic for a free form of doxorubicin. Using the chosen objects, we worked out rather effective, reliable, safe and relatively inexpensive technique for control of cytotoxic activity of nanocomposites, which could be actual for use in development of new medical magnetocarried remedies of targeted delivery, in particular, for oncology.

Keywords: *nanosized single-domain magnetite, doxorubicin, nanocomposites Fe_3O_4/doxorubicin, Fe_3O_4/SiO_2/doxorubicin, Fe_3O_4/TiO_2/doxorubicin, Fe_3O_4/hydroxyapatite/doxorubicin, yeast cells, cytotoxicity, proliferation*

ЛІТЕРАТУРА

1. *Levy L., Sahoo Y., Kim K.-S. et al.* Synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications // Chem. Mater. – 2002. – V. 14. – P. 3715–3721.
2. *Shpak A.P., Gorbyk P.P.* Nanomaterials and Supramolecular Structures. Physics Chemistry, and Applications. – Springer, 2009. – P. 63.
3. *Gorbyk P.P., Chekhun V.F.* Nanocomposites of medicobiologic destination: reality and perspectives for oncology // Functional materials. – 2012. – V. 19, N 2. – P. 145–156.
4. *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. – Chapter 9. – New York: Nova Science Publishers, 2014. – P. 161–198.
5. *Davaran S., Alimirzalu S., Nejati-Koshki K. et al.* Physicochemical characteristics of Fe_3O_4 magnetic nanocomposites based on poly(N-isopropylacrylamide) for anti-cancer drug delivery // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2014. – V. 15, N 1. – P. 49–54.
6. *Anirudhan T.S., Sandeep S.* Synthesis, characterization, cellular uptake and cytotoxicity of a multi-functional magnetic nanocomposite for the targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells // J. Mater. Chem. – 2012. – V. 22. – P. 12888–12899.
7. *Sadighian S., Hosseini-Monfared H., Rostamizadeh K., Hamidi M.* pH-Triggered magnetic-chitosan nanogels (MCNs) for doxorubicin delivery: physically vs. chemically cross linking approach // Adv. Pharm. Bull. – 2015. – V. 5, N 1. – P. 115–120.
8. *Prylutska S.V., Didenko G.V., Potebnya G.P. et al.* Toxic effect of C_{60} fullerene-doxorubicin complex towards normal and tumor cells *in vitro* // Biopolym. Cell. – 2014. – V. 30, N 5. – P. 372–376.
9. *Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O. et al.* C_{60} fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment // Drugs R D. – 2014. – V. 14, N 4. – P. 333–340.
10. *Prylutska S.V., Korolovych V.F., Prylutskyy Yu.I et al.* Tumor-inhibitory effect of C_{60} fullerene complex with doxorubicin // Nanomed. Nanobiol. – 2014. – V. 1, N 2. – P. 1–5.
11. *Orel V.E., Mitrelias T., Tselepi M. et al.* Imaging of Guerin carcinoma during magnetic nanotherapy // J. Nanopharmaceutics Drug Delivery. – 2014. – V. 2. – P. 1–11.
12. *Panchuk R.R., Prylutska S.V., Chumak V.V. et al.* Application of C_{60} fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo* // J. Biomed. Nanotechnol. – 2015. – V. 11, N 7. – P. 1139–1152.
13. *Afanasieva K.S., Prylutska S.V., Lozovik A.V. et al.* C_{60} fullerene prevents genotoxic effect of doxorubicin on human lymphocytes *in vitro* // Ukr. Biochem. J. – 2015. – V. 87, N 1. – P. 91–98.
14. *Prylutska S., Skivka L., Didenko G. et al.* Complex of C_{60} fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy // Nanoscale Res. Lett. – 2015. – V. 10, N 499. – P. 1–7.

15. *Orel V., Shevchenko A., Romanov A. et al.* Magnetic properties and antitumor effect of nanocomplexes of iron oxide and doxorubicin // Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. – 2015. – V. 11, N 1. – P. 47–55.
16. *Kule C., Ondrejickova O., Verner K.* Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast // Mol. Pharmacol. – 1994. – V. 46, N 6. – P.1234–1240.
17. *Patel S., Sprung A.U., Keller B.A. et al.* Identification of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug doxorubicin: implications for the mechanisms of doxorubicin action and cytotoxicity // Mol. Pharmacol. – 1997. – V. 52, N 4. – P. 658–666.
18. *Саенко Ю.В., Шутов А.М., Расторгуева Е.В.* Доксорубицин и менадион вызывают задержку клеточной пролиферации *Saccharomyces cerevisiae* с помощью различных механизмов // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 5. – С. 407–411.
19. *Петрановська А.Л. Абрамов М.В., Туранська С.П. та ін.* Магнітні рідини на основі магнетиту і доксорубіцину для спрямованої доставки лікарського засобу // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2015. – Т. 6, № 3. – С. 343–353.
20. *Кусяк А.П., Туранська С.П., Петрановська А.Л., Горбик П.П.* Адсорбція *цис*-дихлордіамінплатини магніточутливими нанокомпозитами Fe_3O_4/SiO_2 (TiO_2, Al_2O_3) // Казантип-Эко-2014. Инновационные пути решения актуальных проблем базовых отраслей, экологии, энерго- и ресурсосбережения. Сб. тр. XXII междунар. конф. – Харьков, 2014. – Т. 1. – С. 37–42.
21. *Семко Л.С., Горбик П.П., Сторожук Л.П. та ін.* Модифікування магнетиту діоксидом кремнію // Фізика і хімія твердого тіла. – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 526–532.
22. *Коваленко А.С., Гринь С.В., Ильин В.Г.* Особенности темплатного синтеза мезопористых материалов на основе титано-кремниевых эфиров // Теорет. и эксперим. химия. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 46–51.
23. *Семко Л.С., Горбик П.П., Чуйко О.О. та ін.* Модифікування магнетиту діоксидом титану та властивості одержаних нанокомпозитів // Доповіді НАН України. – 2007. – № 2. – С. 150–157.
24. *Туров В.В., Горбик С.П.* Определение сил адгезии на межфазной границе клетка/вода из данных ^{1}H ЯМР спектроскопии // Украинский химический журнал. – 2003. – Т. 69, № 6. – С. 80–85.
25. *Туров В.В., Горбик С.П., Чуйко А.А.* Влияние дисперсного кремнезема на связанную воду в замороженных клеточных суспензиях // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 3. – С. 16–23.
26. *Горбик П.П., Туров В.В.* Наноматериалы и нанокомпозиты в медицине, биологии, экологии. – Киев: Наукова думка, 2011. – 444 с.
27. *Бабаева И.П., Чернов И.Ю.* Биология дрожжей. – Т-во науч. изд. КМК, 2004. – 239 с.
28. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния (Под ред. Чуйко А.А.) – Киев: Наукова думка, 2003. – 417 с.
29. *Туров В.В., Гунько В.М.* Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев: Наукова думка, 2011. – 313 с.
30. *Туранська С.П., Туров В.В., Гунько В.М., Богатирьов В.М.* Асоціати води у частково зневоднених дріжджах і на поверхні гідрофобного кремнезему // Зб. Хімія, фізика та технологія поверхні. – Київ: Вид. дім «КМ Академія». – 2004. – Вип. 10. – С. 207–211.
31. *Turov V.V., Gun`ko V.M., Bogatyrev V.M. et al.* Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface // J. Colloid Interface Sci. – 2005. – V. 283. – P. 329–343.

REFERENCES

1. Levy L., Sahoo Y., Kim K.-S., Bergey E.J., Prasad P. Synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications. *Chem. Mater.* 2002. **14**: 3715.
2. Shpak A.P., Gorbyk P.P. *Nanomaterials and supramolecular structures. Physics chemistry and applications*. (Springer, 2009).
3. Gorbyk P.P., Chekhun V.F. Nanocomposites of medicobiologic destination: reality and perspectives for oncology. *Functional materials.* 2012. **19**(2): 145.
4. Gorbyk P.P., Lerman L.B., Petranovska A.L., Turanska S.P. *Advances in semiconductor research: physics of nanosystems, spintronics and technological applications.* Magnetosensitive nanocomposites with functions of medico-biological nanorobots: synthesis and properties. Chapter 9. (New York: Nova Science Publishers, 2014). P. 161.
5. Davaran S., Alimirzalu S., Nejati-Koshki K., Nasrabadi H.T., Akbarzadeh A., Khandaghi A.A., Abbasian M., Alimohammadi S. Physicochemical characteristics of Fe_3O_4 magnetic nanocomposites based on poly(N-isopropylacrylamide) for anti-cancer drug delivery. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014. **15**(1): 49.

6. Anirudhan T.S., Sandeep S. Synthesis, characterization, cellular uptake and cytotoxicity of a multi-functional magnetic nanocomposite for the targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells. *J. Mater. Chem*. 2012. **22:** 12888.
7. Sadighian S., Hosseini-Monfared H., Rostamizadeh K., Hamidi M. pH-Triggered magnetic-chitosan nanogels (MCNs) for doxorubicin delivery: physically vs. chemically cross linking approach. *Adv. Pharm. Bull.* 2015. **5**(1): 115.
8. Prylutska S.V., Didenko G.V., Potebnya G.P., Bogutska K.I., Prylutskyy Yu.I., Ritter U., Scharff P. Toxic effect of C_{60} fullerene-doxorubicin complex towards normal and tumor cells *in vitro*. *Biopolym. Cell*. 2014. **30**(5): 372.
9. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O., Prylutskyy Yu., Evstigneev M., Scharff P., Ritter U. C_{60} fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs R D*. 2014. **14**(4): 333.
10. Prylutska S.V., Korolovych V.F., Prylutskyy Yu.I., Evstigneev M.P., Ritter U., Scharff P. Tumor-inhibitory effect of C_{60} fullerene complex with doxorubicin. *Nanomed. Nanobiol*. 2014. **1**(2): 1.
11. Orel V.E., Mitrelias T., Tselepi M., Golovko T., Nikolov N., Romanov A., Rykhalskiy A., Barnes C., Yaroshenko O., Orel I., Supruniuk I., Shchepotin I. Imaging of Guerin carcinoma during magnetic nanotherapy. *J. Nanopharmaceutics Drug Delivery*. 2014. **2**: 1.
12. Panchuk R.R., Prylutska S.V., Chumak V.V., Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Evstigneev M.P., Prylutskyy Yu.I., Berger W., Heffeter P., Scharff P., Ritter U., Stoika R.S. Application of C_{60} fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo*. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015. **11**(7): 1139.
13. Afanasieva K.S., Prylutska S.V., Lozovik A.V., Bogutska K.I., Sivolob A.V., Prylutskyy Yu.I., Ritter U., Scharff P. C_{60} fullerene prevents genotoxic effect of doxorubicin on human lymphocytes *in vitro*. *Ukr. Biochem. J.* 2015. **87**(1): 91.
14. Prylutska S., Skivka L., Didenko G., Prylutskyy Yu., Evstigneev M., Potebnya G., Panchuk R., Stoika R., Ritter U., Scharff P. Complex of C_{60} fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy. *Nanoscale Res. Lett*. 2015. **10**(499): 1.
15. Orel V., Shevchenko A., Romanov A., Tselepi M., Mitrelias T., Barnes C.H.W., Burlaka C.H.W., Lukin S., Shchepotin I. Magnetic properties and antitumor effect of nanocomplexes of iron oxide and doxorubicin. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2015. **11**(1): 47.
16. Kule C., Ondrejickova O., Verner K. Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast. *Mol. Pharmacol.* 1994. **46**(6):1234.
17. Patel S., Sprung A.U., Keller B.A., Heaton V.J., Fisher L.M. Identification of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug doxorubicin: implications for the mechanisms of doxorubicin action and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 1997. **52**(4): 658.
18. Saenko Yu.V., Shutov A.M., Rastorgueva E.V. Doxorubicin and menadione reduce cell proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *Cytology.* 2010. **52**(5): 407 [in Russian].
19. Petranovska A.L., Abramov M.V., Turanska S.P., Gorbyk P.P., Kusyak A.P. Magnetic fluids based on magnetite and doxorubicin for targeted delivery of drug. *Him. Fiz. Tehnol. Poverhni.* 2015. **6**(3): 343 [in Ukrainian].
20. Kusyak A.P., Turanska S.P., Petranovska A.L., Gorbyk P.P. Adsorption of *cis*-dichlorodiammineplatinum by magnetosensitive nanocomposites Fe_3O_4/SiO_2 (TiO_2, Al_2O_3). Novel ways to solve actual problems of basic fields, ecology, energy and resource preservation. In*: Kazantip-Eco-2014. XXII international conf.* (Khar'kov, 2014). **1**: 37 [in Ukrainian].
21. Semko L.S., Gorbyk P.P., Storozhuk L.P., Dz'ubenko L.S., Dubrovin I.V., Oranska O.I. Modification of magnetite with silicon dioxide. *Physics and Chemistry of Solid State.* 2007. **8**(3): 526 [in Ukrainian].
22. Kovalenko A.S., Grin' S.V., Il'in V.G. Peculiarities of template synthesis of mesoporous materials based on titano-silicic ethers. *Theor. Exp. Chem.* 2004. **40(**1): 52.
23. Semko L.S., Gorbyk P.P., Chuiko O.O., Storozhuk L.P., Dubrovin I.V., Oranska O.I., Revo S.L. Modification of magnetite with titanium dioxide and properties of the obtained nanocomposites. *Reports of NAS of Ukraine.* 2007. **2**: 150 [in Ukrainian].
24. Turov V.V., Gorbik S.P. Determination of adhesion powers at cell/water interface from the data of ^{1}H NMR spectroscopy. *Ukrainian chemical journal.* 2003. **69(**6): 80 [in Russian].
25. Turov V.V., Gorbik S.P., Chuiko A.A. Influence of dispersed silica on bound water in frozen cellular suspensions. *Cryobiology problems.* 2002. **3**: 16 [in Russian].
26. Gorbyk P.P., Turov V.V. *Nanomaterials and nanocomposites in medicine, biology, ecology.* (Kyiv: Naukova dumka, 2011) [in Russian].
27. Babaeva I.P., Chernov I.Yu. *Yeast biology.* (T-vo of scien. edit. KMK, 2004) [in Russian].
28. *Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide*. (Ed. Chuiko A.A.). (Kyiv: Naukova dumka, 2003) [in Russian].
29. Turov V.V., Gun'ko V.M. *Clustered water and ways of its using.* (Kyiv: Naukova dumka, 2011) [in Russian].

30. Turanska S.P., Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M. Water associates in partly dehydrated yeast and on hydrophobic silica surface. *Coll. Chemistry, Physics and Technology of Surface.* (Kyiv: Vyd. dim «KM Academy», 2004). **10**: 207 [in Ukrainian].
31. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M., Zarko V.I., Gorbik S.P., Pakhlov E.M., Leboda R., Shulga O.V., Chuiko A.A. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface. *J. Colloid Interface Sci.* 2005. **283**: 329.

Надійшла 11.02.2016, прийнята 31.03.2016