

УДК: 621.318.4:616

В.І. Зубчук, канд. техн. наук¹, Е.І. Крючков, канд. техн. наук², В.Е. Орел, д-р біол. наук^{1,2}, О.Ю. Рихальський¹

Механомагнітохімічний реактор для синтезу нанокompatитів протираухлинної терапії

У роботі розглядається технологія механомагнітохімічного синтезу протираухлинного нанокompatиту. Розроблено структурну схему, конструкцію та виготовлено механомагнітохімічний реактор для синтезу протираухлинного нанокompatиту на основі магнітних наночасток Fe_3O_4 з KCl та доксорубіцину. Проведено спектрофотометричні дослідження нанокompatиту з метою оцінки ефектів модифікації доксорубіцину при механомагнітохімічному синтезі.

A mechanomagnetochemical synthesis technology of antitumor nanocomposite for cancer therapy is considered, a flow diagram is developed, and a mechanomagnetochemical reactor for synthesis of nanocomposite for cancer therapy on the basis of magnetic nanoparticles of Fe_3O_4 with KCl and doxorubicin is produced. Spectrophotometric researches of the nanocomposite in optical range for the purpose of estimation of possible doxorubicin modification effects after mechanomagnetochemical synthesis were conducted.

Ключові слова: механомагнітохімічний синтез, реактор, магніточутливий нанокompatит, доксорубіцин, вільні радикали, спектрофотометричний аналіз.

Вступ

В останнє десятиліття у онкологічній клінічній практиці починають все ширше застосовуватися для діагностики та терапії злоякісних новоутворень нанокompatити (НК) на основі наночасток пара- й феромагнітних матеріалів і протираухлинних препаратів, перспективність застосування яких засвідчують експериментальні та клінічні дослідження [1].

На сьогодні найбільшого поширення набула ідея використання НК для лікування злоякісних пухлин, яка полягає у можливості його локальної концентрації за допомогою магнітного поля у патологічній зоні й наступного розігріву тканин за допомогою змінного електромагнітного поля (ЕМП).

Інша ідея застосування НК у клінічній практиці полягає у можливості цілеспрямованої доставки медичних препаратів. В даному випадку

необхідно, щоб препарат був зв'язаний із магнітним носієм, наприклад, магнітними наночастками Fe_3O_4 . Для підвищення біодоступності НК до патологічного вогнища теж доцільно використовувати локальне/регіонарне електромагнітне опромінення радіочастотного діапазону, яке суттєво збільшує потік крові в області пухлини і, як наслідок, покращує протираухлинну дію препарату. В цьому випадку електромагнітна гіпертермія повинна бути помірною і не підвищувати температуру тканин більш ніж на 0,5-1,5 °С. Однак технологія синтезу магніточутливих НК ще не є досконалою й потребує детального вивчення.

Серед основних проблем, що стримують широке впровадження в клінічну практику комплексного лікування онкологічних хворих з використанням магніточутливих НК при локальному розігріві тканин змінним ЕМП можна зазначити: незначна поверхнева селективність мікро- і наночасток між злоякісними та нормальними клітинами, негативний вплив сильних електромагнітних полів на тканини і органи; побічні ефекти накопичення НК в інших тканинах та органах [2].

Метою даної роботи є розробка та дослідження технології механомагнітохімічного синтезу (ММХС) НК та відповідного реактору для її реалізації.

1. Розробка конструкції реактору для реалізації механомагнітохімічного синтезу нанокompatитів

Найбільш близькою до механомагнітохімічної технології, що розробляється, є технологія механохімічного синтезу, яка базується на активації механохімічних реакцій у речовині чи композиті внаслідок механічного впливу [3]. При механохімічних реакціях, індукованих процесами механічного удару, або внаслідок контактної електризації зростає число парамагнітних центрів з вільними радикалами, які є активними протираухлинними факторами впливу на злоякісні новоутворення [4].

Механомагнітохімічна технологія - це метод сухого синтезу протираухлинного НК, який базується на інтеграції двох складових: механохімії та одночасного електромагнітного опромінення. Іншими словами, технологія ММХС полягає у механохімічній активації та електромагнітному опроміненні композиту магнітних мікро- та нано-

часток і протипухлинного препарату. Для цих цілей був розроблений реактор (рис. 1), що складається із наступних структурних блоків: височастотного генератора (ВЧ-генератор) (1), механохімічного реактора (2), частотоміра (3), пульту керування (4).

За допомогою ВЧ-генератора ініціюється електромагнітне опромінення нанокompatиту. До складу ВЧ-генератора входить блок живлення (1-1), блок генерації сигналу (1-2). Контроль за частотою сигналу, що генерується, здійснюється за допомогою частотоміру (3).

Механохімічний реактор має наступну конструкцію: аплікатор (2-10) встановлено на спеціальній підставці (2-9), яка розташована на верхній панелі самого реактора. В центрі та всередині аплікатора розташовується камера (2-8), в якій здійснюється безпосередній синтез НК. В центрі, один навпроти одного, біля аплікатора розташовуються постійні магніти різної полярності (2-6 та 2-7) по відношенню до камери, які утворюють постійне магнітне поле. Камера механічно зв'язана із лінійним двигуном (2-4), який забезпечує коливання камери із заданою частотою. Частота коливання камери задається через блок керування (2-2), який може корегувати процес управління підсилювачем потужності (2-3) лінійного двигуна в залежності від показань датчика положення (2-5). Живлення всіх елементів

реактора забезпечується його власним блоком живлення (2-1).

Керування реактором здійснюється через пульт керування (4).

2. Методика активації та синтезу магніточутливого нанокompatиту

В роботі проводилось дослідження магніточутливого НК на основі наночасток Fe_3O_4 з KCl , діаметром 20–40 нм, отриманих із застосуванням технології електронно-променевого випаровування й конденсації у вакуумі неорганічних матеріалів [5] та протипухлинного препарату доксорубіцину (ДР).

Для використання Fe_3O_4 з KCl в експерименті його попередньо очищували від надлишку KCl . Методика очищення була наступною: 500 мг Fe_3O_4 з KCl розчиняли в 5 мл дистильованої води та інкубували на водяній бані при постійному помішуванні. Потім проводили центрифугування отриманого розчину при 3000 об/хв і зливали надосадову рідину. Осад знову розчиняли в 5 мл дистильованої води, інкубували на водяній бані та центрифугували. Дану процедуру повторювали 3 рази. Отриманий очищений Fe_3O_4 з KCl висушували в термостаті за температури 60 °С.

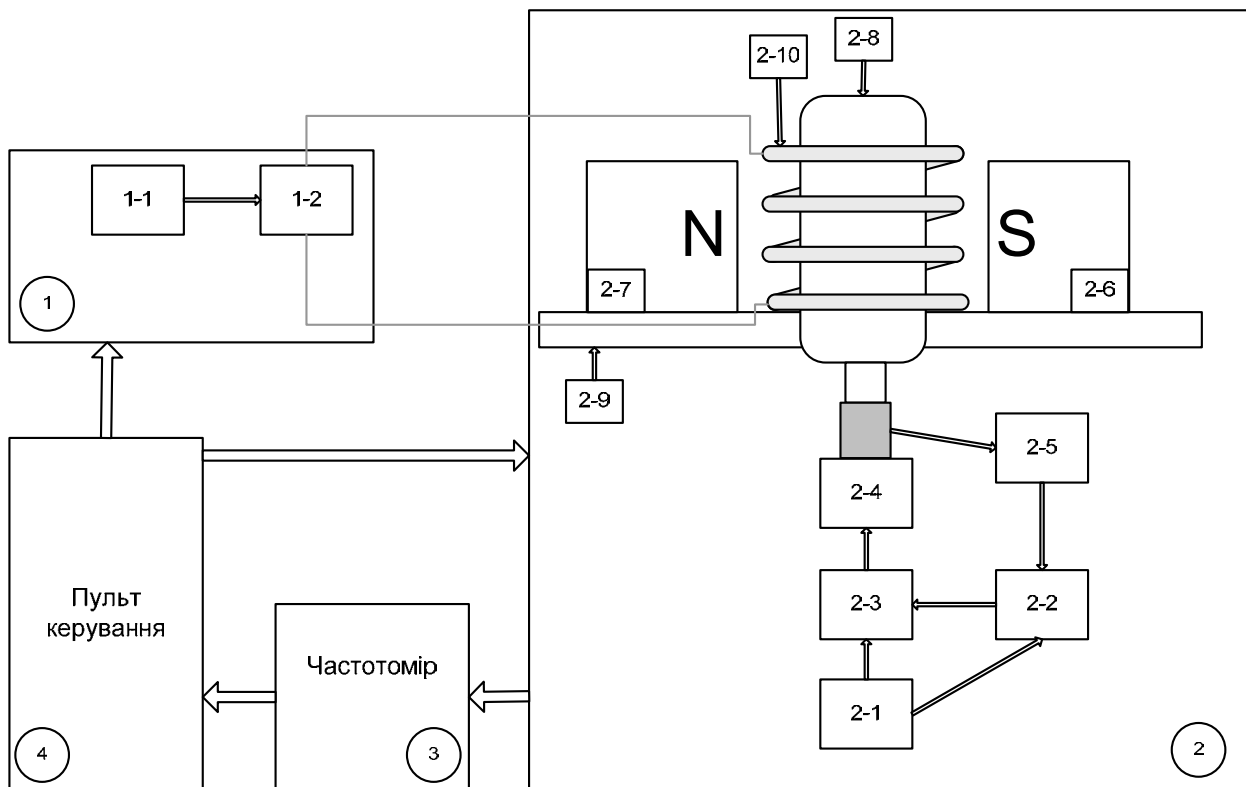


Рис. 1. Структурна схема реактору для ММХС

Процедуру активації препарату або синтез проводили наступним чином. В активаційну камеру реактора поміщали або препарат, або суміш ДР та наночасток і три кульки, виготовлені із сталі 12Х18Н9Т. Останні безпосередню забезпечуючи механічні удари при синтезі чи механоактивації препаратів. Механо- або механомагнітохімічну активацію чи синтез проводили при одночасному підведенні механічної енергії 20 Вт/г з частотою коливання камери 30 Гц й дії електромагнітного поля (ЕМП) 40 МГц з вихідною потужністю 75 Вт та постійного магнітного поля 1900 А/м. Синтезований НК розчиняли у дистильованій воді.

3. Дослідження спектрофотометричних характеристик магніточутливого нанокомпозиту

Спектрофотометричні дослідження НК на основі магнітних наночасток Fe_3O_4 з КСІ та ДР в оптичному діапазоні були проведені для оцінки ефектів модифікації молекул ДР при ММХС. Для цього використовувався апарат NanoDrop 1000 («Thermo Scientific», США). Спектральні залежності значення коефіцієнту екстинкції, який характеризує ослаблення пучка світла в речовині за рахунок сумісної дії поглинання та розсіювання світла, вимірювались по відношенню до дистильованої води.

Під час проведення досліджень було помічено, що достатньо велика частина ДР і наночасток після ММХА залишаються на поверхні камери, у якій проводиться синтез чи активація. За оціночними даними при використанні камери із полімерних матеріалів на її поверхні сорбується порядку $30 \pm 5\%$ ДР, що не переходить у розчин. Для компенсації ефектів сорбції ДР внаслідок процедури активації пропонується вводити корективи в сторону збільшення концентрації ДР у НК.

Спектр екстинкції синтезованого НК із ДР та Fe_3O_4 з КСІ з розрахунковою концентрацією ДР 1,33 мг/мл у вихідному розчині порівняли до спектру офіційного ДР із такою ж концентрацією. Значення коефіцієнту екстинкції ДР в ультрафіолетовій частині спектру мали відносно великі флуктуації, що було пов'язано з кінцевим значенням роздільної здатності спектрофотометру. Тому концентрацію ДР у розчині оцінювали за допомогою коефіцієнту екстинкції при $\lambda = 481$ нм. В результаті проведення експерименту було встановлено, що концентрація ДР у надосадовому розчині НК була значно менша, ніж у контрольному розчині ДР в середньому на 35 – 50 %. Дане явище могло безпосередньо вказувати на сорбцію ДР наночастками Fe_3O_4 .

Однак, для реалізації протипухлинної дії, НК повинен у паталогічній зоні дисоціювати на медичний препарат та його носій. Враховуючи це, було проведено два додаткових досліді: 1) на

розчин синтезованого НК після механомагнітохімічної активації (ММХА) діяли змінним ЕМП з частотою 40 МГц та потужністю 100 Вт, що могло спричинити появу явища магніострикції у наночастках та внаслідок цього ініціювати десорбцію ДР від наночастинок; 2) дія на розчин композиту ультразвуком (УЗ) за допомогою апарату УЗДН-А, що могло б спричинити вихід ДР із наночастинок внаслідок механічних коливань. Результати спектральних досліджень коефіцієнту екстинкції зразків даних груп наведені на рис. 2.

Аналізуючи дані на рис. 2, слід зазначити, що спектри екстинкції для НК ДР і Fe_3O_4 з КСІ після ММХА без та з наступною дією ЕМП та УЗ майже не відрізнялися і вплив на розчин НК за допомогою ЕМП та УЗ не збільшує концентрацію ДР у вихідному розчині.

Для диференціації безпосереднього ефекту впливу механохімічної та механомагнітохімічної активації на ДР були проведені спектрофотометричні дослідження трьох груп: 1 група – офіційний ДР; 2 група – механохімічно активований (МХА) ДР; 3 група – ММХА ДР.

Отримані залежності значень коефіцієнту екстинкції від концентрації офіційного, МХА та ММХА ДР у досліджуваних розчинах наведено на рис. 3.

Наведені на рис. 3. залежності прямують до лінійних із середнім коефіцієнтом кореляції між лінійною апроксимацією та експериментальними даними $R^2 = 0,989$. З цього випливає, що коефіцієнт екстинкції можна використовувати для оцінки концентрації ДР у розчині. Рівняння апроксимуючих прямих залежностей коефіцієнту екстинкції від концентрації розчину наведено у табл. 1, де k – коефіцієнт екстинкції, C – концентрація ДР у розчині.

Таблиця 1. Результати лінійної апроксимації залежностей коефіцієнту екстинкції від концентрації розчину

Група	Рівняння апроксимуючої прямої	R^2
1. ДР	$k = 0,232C + 0,011$	0,986
2. МА ДР	$k = 0,252C - 0,016$	0,996
3. ММХА ДР	$k = 0,221C - 0,019$	0,986

Характер залежностей, зображених на рис. 3, та відповідних їм рівнянь ліній апроксимації не дають в повній мірі оцінювати модифікацію ДР в результаті процедури МХА та ММХА, оскільки значення коефіцієнтів екстинкції зразків усіх 3 груп мали невеликі розбіжності, які були зумовлені методичною похибкою експерименту. Тому, для аналізу спектрів екстинкції ДР було вирішено ввести додаткові параметри окрім локального максимуму екстинкції при довжині хви-

лі $\lambda_3 = 481$ нм в діапазоні довжин хвилі 400-600 нм: локальні максимуми, які відповідали довжині хвилі $\lambda_1 = 232$ нм та $\lambda_2 = 250$ нм і локальний мінімум при довжині хвилі $\lambda_{\min} = 334$ нм. Оскільки, в результаті процедур МХА та ММХА змінюва-

лися амплітудні значення коефіцієнтів екстинкції, то для оцінки модифікації молекул ДР використовували відношення λ_i/λ_{\min} , де $\lambda_i = \lambda_1, \lambda_2$ або λ_3 , Залежність відношення λ_3/λ_{\min} від концентрації ДР у розчині наведено на рис. 4.

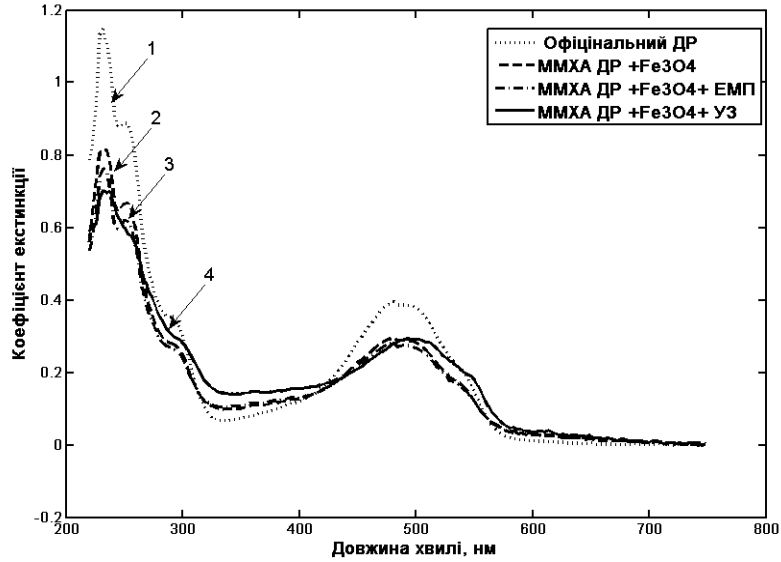


Рис. 2. Спектри екстинкції ДР (1) та НК ДР і Fe₃O₄ з КСІ після ММХА без (2) та з наступною дією ЕМП (3) та УЗ (4)

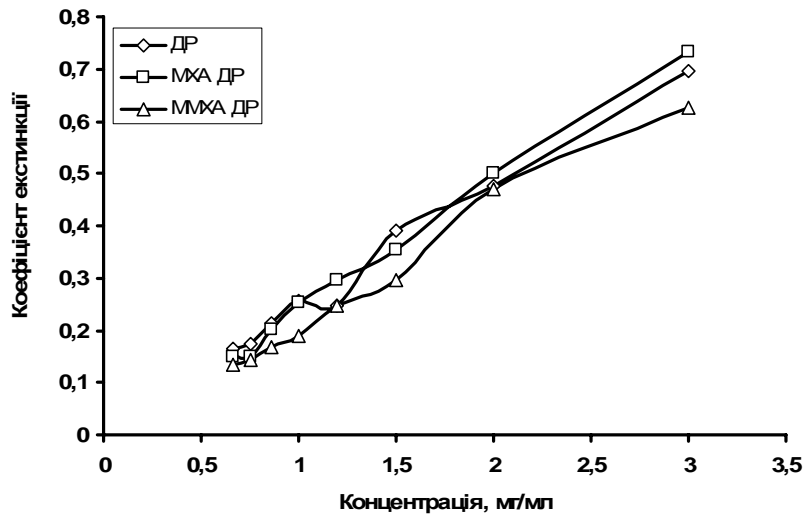


Рис. 3. Залежності коефіцієнту екстинкції ДР, МХА та ММХА ДР від концентрації розчину при $\lambda = 481$ нм

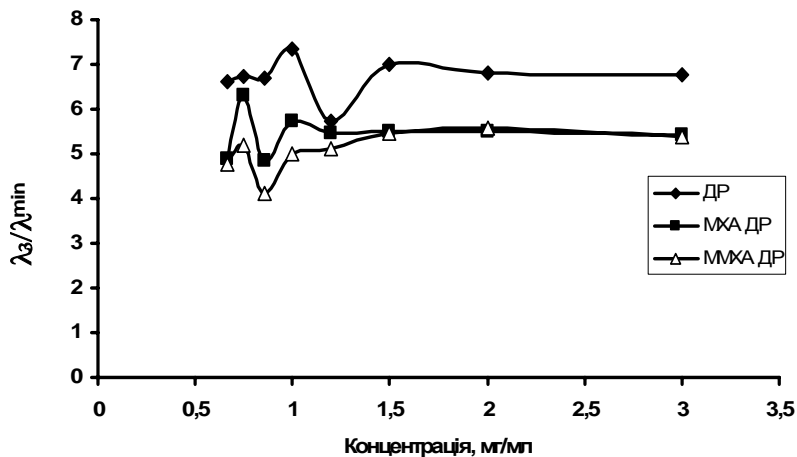


Рис. 4. Залежності відношення λ_3/λ_{\min} від концентрації у розчинах офіційного ДР, МХА та ММХА ДР

Аналізуючи наведені на рис. 4 графіки, можна відмітити, що при концентраціях ДР в межах 1,5 – 3 мг/мл у розчинах усіх 3 груп, відношення λ_3/λ_{\min} є постійним і не залежить від концентрації. При концентраціях ДР у вихідних розчинах менше 1,5 мг/мл спостерігаються вже достатньо суттєві коливання відношення λ_3/λ_{\min} в залежності від концентрації.

Самі криві для ДР після МХА та ММХА мали достовірно менше значення λ_3/λ_{\min} у порівнянні із кривою офіційного ДР, що свідчило про зміну спектральних характеристик розчинів активованого ДР і, як наслідок, модифікацію молекул ДР. Проте, слід провести додаткові дослідження щоб мати змогу однозначно судити про збільшення або зменшення протипухлинної активності МХА або ММХА ДР.

Висновки

У даній роботі було розроблено структурну схему, конструкцію та виготовлено механомагнітохімічний реактор для синтезу протипухлинного нанокompозиту. Проведені випробування та пілотні дослідження механомагнітохімічного реактору свідчать про перспективність наступних доклінічних досліджень механохімічно синтезованих нанокompозитів на основі Fe_3O_4 з КСІ та протипухлинного препарату доксорубіцину за умов введення корекції в концентрацію доксорубіцину у нанокompозиті через можливі ефекти його сорбції наночастинками та поверхнею робочої камери під час синтезу або активації препарату. Проведені спектрофотометричні дослідження механомагнітохімічно активованого док-

сорубіцину свідчать про модифікацію його молекул внаслідок процедури активації, але необхідно провести додаткові дослідження щодо більш детального вивчення впливу змін властивостей активованого доксорубіцину на його протипухлинну активність.

Література

1. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy / X.H. Peng, X. Qian, H. Mao [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. 311–321.
2. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme / K. Maier-Hauff, R. Rothe, R. Scholz [et al.] // *J. Neur. Oncol.* – 2006 – Vol. 81, N 1. – P. 53–60.
3. Wetting properties of silicon films from alkyl-passivated particles produced by mechanochemical synthesis / M. J. Fink, S. Hallmann, B. S. Mitchell // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2010. – Vol. 348. – P. 634–641.
4. Mechanochemically activated doxorubicin nanoparticles in combination with 40 MHz frequency irradiation on A-549 lung carcinoma cells / V. Orel, Y. Kudryavets, N. Bezdenezhnikh [et al.] // *Drug Delivery*. – 2005. – Vol. 12. – P. 171–178.
5. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине – первые шаги // *Вісн. фармакол. і фармації*. – 2007. – № 12. – С. 5–13.

¹ *Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»*

² *Национальный институт рака МОЗ Украины*