

УДК 539.211

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С КЛЕТКАМИ

С.П. Туранская, А.П. Кусяк, В.В. Туров, П.П. Горбик

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины,
ул. Генерала Наумова, 17, Киев 03164, Украина, gorbyk@isc.gov.ua*

*Выполнен обзор работ по исследованию воздействия на живые клетки наноразмерных магнитных частиц, условий придания им биосовместимости и областей использования. Приводятся данные о механизмах цитотоксичности, ее зависимости от химического состава, размеров, концентрации наночастиц, типа защитного покрытия, а также биodeградации наноматериалов в условиях *in vivo* и *in vitro*.*

Введение

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о перспективности использования магнитоуправляемых наноматериалов для решения ряда актуальных медицинских и биологических задач. На их основе созданы уникальные нанокомпозиты с многоуровневой иерархической архитектурой, обладающие функциями медико-биологических нанороботов: способностью распознавания микробиологических объектов в биологических средах, направленного транспорта и депонирования лекарственных препаратов в органах-мишенях, диагностики и терапии заболеваний на клеточном уровне, адсорбции и удаления продуктов клеточного распада под воздействием магнитного поля. Экспериментальные физико-химические данные, медико-биологические исследования *in vitro* и *in vivo* подтверждают их перспективность для создания новых форм комплексных лекарственных препаратов с цитотоксическим, иммунотерапевтическим и гипертермическим действием, иммуномагнитных сорбентов, средств для деконтаминации вирусов из плазмы и сыворотки донорской крови человека, нейтронзахватной терапии и др.

Однако остаются актуальными вопросы, связанные с воздействием магнитных наночастиц на живые клетки и организмы, а также токсикологическими аспектами применения магнитных наноматериалов. До конца не выяснены механизмы повреждающего воздействия наноматериалов на клеточные структуры и организмы, процессы биodeградации наночастиц в биологических средах, зависимость токсичности наночастиц от их концентрации, физико-химических свойств покрытия и т.п. Освещению указанных вопросов в научной литературе последних лет посвящен настоящий обзор.

Биогенный магнетит

В 1975 г. в множестве прокариотов были обнаружены внутриклеточные образования, содержащие кристаллы магнетита (названные магнитосомами) [1]. Магнитосомы состоят из большого количества связанных между собой индивидуальных наночастиц феррита, окруженных мембраной (магнитосомной везикулой). Размеры магнитных наночастиц в магнитосомах колеблются в диапазоне от 10 до 40 нм, по другим данным – от 35 до 120 нм в соответствии с различными типами бактерий. Также было обнаружено, что магнитосомы размещаются вдоль длинной оси

бактерий, обычно на стороне флагелл или узла флагелл, т.е. вблизи органа движения клеток. Согласно гипотезе эти бактерии способны чувствовать геомагнитное поле Земли благодаря наличию магнитосом, другими словами, бактерии имеют магнитный тропизм, называемый магнитотаксисом или магнитотропизмом. Открытие магнетита в бактериях привело к постановке вопроса о физиологической функции этого ферромагнитного материала: является ли магнитотаксис единственной функцией магнитосом? Этот вопрос до сих пор открыт. Специфичные гены *tam* и *mms*, а также кодируемые ими белки (называемые магнитосомными мембранными белками) ответственны за синтез магнитосом. Количество магнитных наночастиц значительно уменьшается или их продуцирование прекращается совсем в случае подавления экспрессии генов *tam* и *mms*, кодирующих белковую оболочку магнитосомы [1].

Последующими исследованиями показано [2], что многие многоклеточные организмы в процессе биохимических реакций синтезируют биогенный магнетит и другие соединения железа, такие как магемит ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$) и грейгит (Fe_3S_4), которые имеют магнитный момент в три раза меньший, чем у магнетита. Биоминерализованный магнетит был найден в ископаемых остатках организмов, моллюсках, рыбах и других животных, тканях мозга и иных органах человека [3]. В частности, биогенный магнетит обнаружен в тканях и органах акул, скатов, дельфинов, многих мигрирующих птиц, улиток, шершней, пчел и других животных.

Применение ультрачувствительной магнитометрии позволило установить, что наночастицы феррита располагаются в тканях различных оболочек мозга человека в количестве от 5 до 100 миллионов наноразмерных кристаллов на грамм вещества оболочки [4, 5]. Распределение частиц по размерам имеет два максимума: для области малых частиц со средним размером около 33 нм и для области больших частиц в диапазоне от 90 нм до 200 нм. Поскольку переход из суперпарамагнитного состояния в ферримагнитное происходит при размерах наночастиц магнетита от 25 до 30 нм, оба указанные компонента присутствуют в мозге человека. Наночастицы магнетита организованы в линейные цепи длиной несколько мкм, количество кристаллов в цепи достигает 80. Несмотря на интенсивные исследования свойств наночастиц биогенных ферритов, природа их происхождения и физиологические функции в многоклеточных организмах остаются невыясненными. Были установлены патологии, сопровождающиеся изменением количества наночастиц биогенного феррита. Роль биогенного магнетита с ферримагнитными свойствами в нейрологических и нейродегенеративных болезнях (Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, эпилепсии) изучалась в работах [6 – 9].

Области применения клеток, меченых магнитными наночастицами

Магнитные наночастицы применяются для разделения клеточных смесей, выделения моноклональных антител из гибридомных культур клеток, получения иммунодиагностических препаратов, выделения фагоцитов человека и животных, иммобилизации ферментов, избирательного контрастирования клеток и молекулярных структур при электронной микроскопии, определения жизнеспособности и активности клеток и других диагностических тестов, моделирования заболеваний, например иммунодефицитного состояния, диссеминированного свертывания крови, гепато- и нефропатии, а также для исследования внутриклеточных процессов. Используются коллоидные частицы магнетита с высокой электронной плотностью, которые управляются магнитным полем, легко проникают в малые кровеносные сосуды и живые клетки (соизмеримы с белковыми глобулами и толщиной мембраны). В биологии и медицине используются различные типы коллоидных магнитных частиц и

способы их применения, включая сочетание с воздействием постоянных магнитных полей, ВЧ- и СВЧ-излучений, ультразвука [10].

Магнитное мечение гладкомышечных клеток наночастицами магемита позволяет детектировать клетки методом магнитнорезонансного получения изображений (MRI) после их локальной трансплантации в сердце. Магнитное мечение не уменьшало жизнеспособность гладкомышечных клеток [11].

Меченые магнитными наночастицами стволовые эндотелиальные клетки, приводимые в движение магнитным полем, способны достигать места повреждения кровеносных сосудов и сердца и накапливаться в зоне повреждения в количестве, в 5 раз большем, чем контрольные немеченые клетки [12].

Способность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга внедряться в некоторые опухоли и метастазы использовалась для уменьшения массы опухолей на моделях глиомы, рака молочной железы, меланомы и колоректальной опухоли мышей, что приводило к продлению времени их жизни. При визуализации клеток методом магнитнорезонансной томографии показано, что свободные частицы железа и меченые железом умершие клетки не создают отклик MRI, что связано с выведением железа из организма, и только живые меченые железом клетки давали сигнал магнитного резонанса [13].

Очень малые суперпарамагнитные частицы оксида железа использовали в качестве контрастирующего агента для MRI. Поглощение железа посредством эндоцитоза человеческими мезенхимальными стволовыми клетками подтверждалось гистологическими исследованиями при окрашивании прусским голубым и количественно определялось методом масс-спектрометрии. По сравнению с немечеными клетками мечение очень малыми суперпарамагнитными частицами оксида железа не повлияло ни на жизнеспособность, ни на способность к пролиферации. Также показано (гистологически и при исследовании генной экспрессии), что включение в человеческие мезенхимальные стволовые клетки железа не помешало нормальному прохождению их дифференциации [14].

Цитотоксичность наночастиц

Токсическое воздействие наноразмерных частиц на клетки обусловлено их высокой реакционной способностью, эффективными диффузией сквозь биологические мембраны и преодолением тканевых барьеров [15].

Наночастицы с сильными окислительными (CeO_2 , Mn_3O_4 , Co_3O_4) или восстановительными (Fe^0 , Fe_3O_4 , Ag^0 , Cu^0) свойствами могут быть цитотоксичными и генотоксичными по отношению к биологическим мишеням в условиях *in vitro*. Один из основных источников токсичности – электронный и/или ионный перенос, происходящий в процессе окисления-восстановления, растворения и каталитических реакций либо внутри кристаллической решетки наночастиц, либо при выходе в культуральную жидкость [16]. Другие механизмы токсичности заключаются в разрыве целостности мембраны или нарушении нативных цепей транспорта ионов и электронов после адсорбции наночастиц на основе железа на клеточной стенке бактерий [17].

В клетках, подвергнутых воздействию суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, ослабевают функции митохондрий, происходят воспалительные процессы, апоптоз, утечка биологически активных молекул сквозь клеточную мембрану, генерация реакционно активных форм кислорода, увеличение количества микроядер (что свидетельствует о повреждении хромосом и является показателем генотоксичности), а также конденсация хромосом [15]. Реакционно активные формы кислорода, такие как супероксид-анион $\text{O}_2^{\cdot-}$, гидроксил-радикал, синглетный кислород, при взаимодействии с компонентами ДНК приводят к нарушению их структуры [18].

Инъекция до 5 мг наночастиц Fe_3O_4 внутрь мозга крыс не приводила к необратимым нарушениям его жизненно важных функций [19].

Как показали исследования разрыва клеток [20] по измерению выхода из них лактатдегидрогеназы, образования оксида азота (V) и индукции апоптоза, наночастицы гематита крупнее 90 нм не оказывают видимых признаков токсичности на альвеолярные макрофаги мыши и эпителиальные клетки легких человека. Наночастицы гематита не приводят к повреждению ДНК в клетках A549 после выдержки в течение 4 ч при концентрации наночастиц $20 - 40 \text{ мкг/см}^2$, в то время как инкубация в течение 24 ч с наночастицами в концентрациях 10 и 50 мкг/см^2 способствует возникновению разрывов ДНК, о чем свидетельствуют результаты электрофореза в геле фрагментов ДНК. Уменьшение размера частиц может приводить к их токсическому воздействию на клетки.

Оксиды железа обладают слабой цитотоксичностью, отчетливых различий при воздействии на клетки частиц различных размеров не наблюдается (в отличие от оксида меди CuO , наночастицы которого были гораздо более цитотоксичными по сравнению с микрочастицами) (рис. 1). Микрочастицы Fe_2O_3 и TiO_2 обладают значительно большей токсичностью по отношению к клеточной ДНК, чем наночастицы той же концентрации (рис. 2). Активность митохондрий (рис. 3) определяли по деполаризации митохондриальных мембран при окрашивании катионным липофильным флуоресцентным красителем (этиловым эфиром тетраметилродамина). Если внутренний мембранный потенциал утрачен, флуоресценция не наблюдается [21].

Вдыхание пыли, содержащей магнетит, оказывает токсическое воздействие на ДНК эпителиальных клеток легких человека (A549). Исследовали [22] четыре фракции магнетита: сыпучий материал (0,2 – 10 мкм), вдыхаемую фракцию (2 – 3 мкм), альвеолярную фракцию (0,5 – 1,0 мкм) и наночастицы (20 – 60 нм). Изучали поглощение магнетита клетками A549 после выдержки в течение 24 ч. Снимки, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии, свидетельствуют о включении частиц магнетита в клетки A549 посредством эндоцитоза. Частицы находятся в виде агломератов в связанных с цитоплазмой везикулах, немного частиц – в цитоплазме и совсем не обнаруживаются в ядре. Для всех изучаемых фракций, после выдержки в течение 24 ч, наблюдается увеличение образования реакционно активных форм кислорода, определяемых с применением 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата, которые могут приводить к значительному разрушающему воздействию на гены клеток [22].

Обработка макрофагов N-ацетил-L-цистеином или Tгоlox™ (два различающихся по механизму действия антиоксиданта) препятствует запуску процессов апоптоза и возникновению цитотоксических эффектов [23].

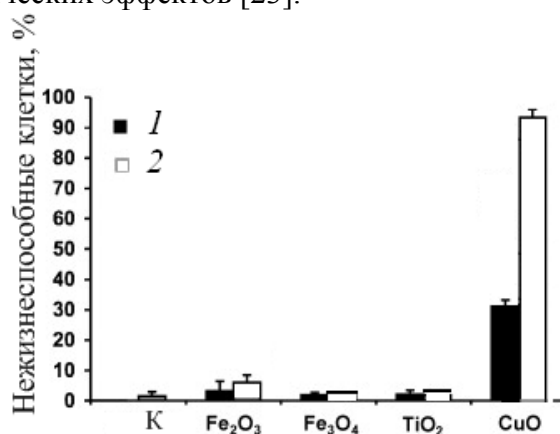


Рис. 1. Жизнеспособность клеток A549 после воздействия микро- (1) и наночастиц (2) в концентрации 40 мкг/см^2 в течение 18 ч (цитотоксичность измеряли окрашиванием трипановым голубым): К – контроль.

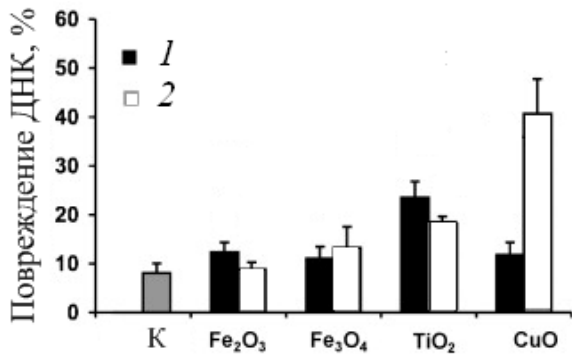


Рис. 2. Повреждение ДНК в культуре клеток А549 после воздействия наночастиц и частиц микрометрового диапазона в концентрации 40 мкг/см² в течение 4 ч (результаты получены при использовании теста comet – методом электрофореза в геле): К – контроль.

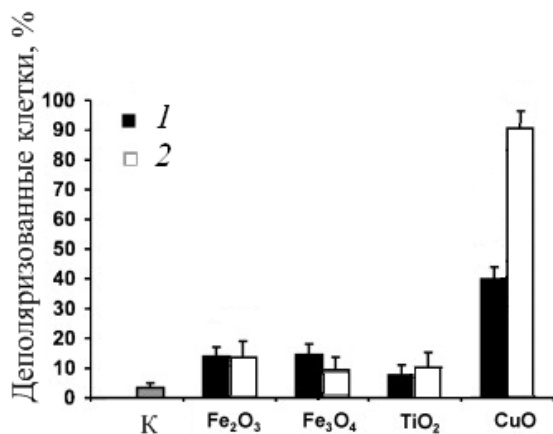


Рис. 3. Повреждение митохондрий в клетках А549 после воздействия наночастиц и частиц микрометрового диапазона в концентрации 40 мкг/см² в течение 16 ч: К – контроль.

Биосовместимость наночастиц с модифицированной поверхностью

Для усовершенствования биосовместимости наночастиц магнетита и избежания их опсонизации (адсорбции белков-опсоинов, распознаваемых клетками иммунной системы) их покрывают различными полимерами, например декстраном или полиэтиленгликолем. Возможность образования несплошных покрытий при этом может вызывать токсическое воздействие на ткани [22].

Покрытые карбоксидекстраном суперпарамагнитные наночастицы, сердцевина которых содержала Fe₃O₄ и γFe₂O₃, были токсичными для макрофагов человека, жизнеспособность клеток находилась в зависимости от времени выдержки и концентрации (рис. 4). Частицы меньшего размера (20 нм) содержали такую же сердцевину, как и более крупные (60 нм), но оболочку карбоксидекстрана тоньше [23].

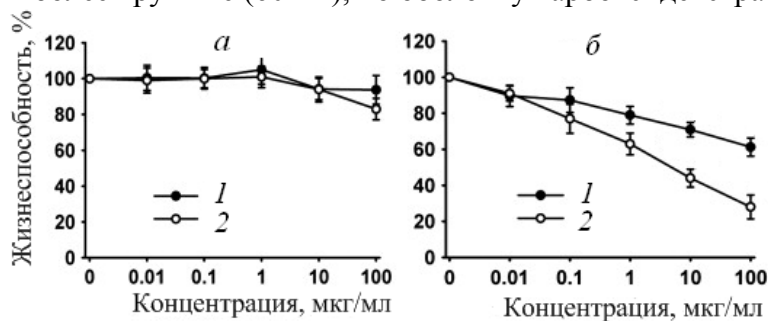


Рис. 4. Зависимость жизнеспособности клеток от времени воздействия (а – 1 сут, б – 5 сут) и концентрации наночастиц оксида железа, покрытых карбоксидекстраном; средний диаметр частиц: 1 – 60 нм; 2 – 20 нм.

Покрытые декстраном магнитные наночастицы аккумулируются в различных типах клеток через несколько часов инкубации в культуральной жидкости. Результаты исследований [24] показывают, что при поглощении клетками непокрытых и покрытых декстраном наночастиц оксида железа изменения поведения и морфологии клеток различны, так что ответ клеток на введение в них таких частиц зависит от свойств их покрытия. Вероятно, вследствие эндоцитоза жидкой фазы, поведение фибробластов изменяется после поглощения покрытых декстраном магнитных частиц: возможен апоптоз, нарушение морфологии и уменьшение подвижности клеток.

Методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии показано, что в зависимости от степени окисления железа (Fe^{2+} или Fe^{3+}) в покрытых декстраном наночастицах оксида железа наблюдаются значительные различия в поглощении клетками и повреждении ДНК. Покрытый декстраном магемит с соотношением $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 0,118 обладает значительной генотоксичностью, которая коррелирует с поглощением железа клетками, по сравнению с покрытым декстраном магнетитом с соотношением $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 0,435, что указывает на большую способность ионов Fe^{3+} к повреждению ДНК [15].

Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа со средним размером 30 нм, покрытые сурфактантом Tween 80, не оказывают существенного токсического воздействия на мышинные макрофаги (клетки J774) в концентрации до 100 мкг/мл после выдержки в течение 6 ч. Токсичность определялась индукцией оксидативного стресса и последующим апоптозом. Проведение теста жизнеспособности клеток с применением 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (тест МТТ) показало, что жизнеспособность клеток превышает 95 % после выдержки до 3 ч в концентрации наночастиц 25–200 мкг/мл, в то время как большие концентрации (300–500 мкг/мл) и время выдержки (6 ч) приводят к снижению жизнеспособности до 55–65 %. Окрашивание йодидом пропидия и Hoechst-33342 свидетельствует о том, что гибель большинства клеток происходила путем апоптоза. Применение теста H2DCFDDA (карбокситетракарбокси-2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетат, чувствительный к пероксиду флуоресцентный зонд) для подсчета генерации внутриклеточных реакционно активных форм кислорода (ROS) показывает, что выдержка в суспензии наночастиц большей концентрации приводит к увеличению генерации ROS, повреждению и гибели клеток. Повреждение клеточных мембран наночастицами, изучаемое по выходу из клеток лактатдегидрогеназы, зависит от концентрации наночастиц и времени выдержки. Таким образом, использование суперпарамагнитных наночастиц оксида железа в малых концентрациях – важное условие для избежания повреждения, обусловленного оксидативным стрессом, и гибели клеток [25].

Для перенесения синтезированных наночастиц Fe_3O_4 из гексана в водную среду использовали биполярный сурфактант 11-аминоундеканоат тетраметиламмония. Исследования цитотоксического воздействия наночастиц Fe_3O_4 на клеточные линии глиальных клеток человека, рака молочной железы и нормальных клеток показывают крайне низкую токсичность и хорошую биосовместимость наночастиц в концентрационном диапазоне 0,1–10 мкг/мл, в то время как предельно обнаружимая цитотоксичность наблюдается при концентрации наночастиц Fe_3O_4 100 мкг/мл. Наночастицы, покрытые биполярным сурфактантом 11-аминоундеканоатом тетраметиламмония, являются биосовместимыми и могут использоваться для направленной доставки лекарственных препаратов, получения изображений методом магнитного резонанса и магнитной гипертермии [26].

Проникновение в клетки и биосовместимость наночастиц оксида железа, функционализированных четырьмя углеводородами с различным поверхностным

зарядом, изучали при использовании клеточной линии карциномы HeLa [27]. Нейтральные, положительно и отрицательно заряженные наночастицы получали покрытием декстраном, аминдекстраном, гепарином и димеркаптосукциновой кислотой. Их коллоидные суспензии были стабильными при pH 7, агрегаты частиц имели близкие размеры. При инкубации клеток с нейтральными наночастицами поглощения их клетками не наблюдается, в то время как отрицательно заряженные частицы имеют различное поведение в зависимости от природы покрытия. Наночастицы, покрытые димеркаптосукциновой кислотой, слабо поглощаются клетками при отсутствии токсического воздействия, в то время как покрытые гепарином частицы поглощаются только при высоких концентрациях наночастиц и приводят к нарушению конфигураций веретена деления в процессе митоза. Положительно заряженные магнитные наночастицы обладают удовлетворительными свойствами для их использования в биомедицине в условиях *in vivo* – обнаружения клеток методом MRI и лечения рака посредством гипертермии, поскольку они: 1) проникают в клетки с высокой эффективностью и локализуются в эндосомах; 2) легко детектируются внутри клеток методами оптической микроскопии; 3) удерживаются в течение сравнительно большого периода времени; 4) не оказывают цитотоксического воздействия.

Методами просвечивающей электронной микроскопии и окрашивания прусским голубым установлено [28]: наночастицы Fe₃O₄, покрытые димеркаптосукциновой кислотой (DMSA), эффективно проникают в клетки RAW264.7 (мышинные макрофаги) и локализуются в цитоплазматических включениях, что не приводит к существенному снижению жизнеспособности клеток при концентрациях магнитных наночастиц 20, 30, 50 и 100 мкг/мл и времени инкубации 2, 12, 24, 48, 72 ч и свидетельствует о высокой биосовместимости нанокомпозитов Fe₃O₄-DMSA.

Значительное уменьшение жизнеспособности клеток (фибробластов кожи человека) наблюдается [15] после воздействия на них магемита, покрытого DMSA, в концентрации 10⁻⁶ – 10⁻³ мг/мл. Однако при более высокой концентрации (100 мкг/мл) жизнеспособность клеток не уменьшается, но происходит значительное повышение метаболической митохондриальной активности. Отсутствие воздействия на жизнеспособность может объясняться увеличением размера агрегатов частиц от ~ 30 до 70 нм при более высоких концентрациях, что приводит к уменьшению эффективности контактов между наночастицами магемита, покрытыми DMSA, и клетками.

Хорошо стабилизированные наночастицы магемита, покрытые DMSA, обладали слабым цитотоксическим воздействием на фибробласты кожи человека при отсутствии генотоксических эффектов [29].

Исследовали биосовместимость и распределение в организме наночастиц магемита, стабилизированных DMSA, через 12 ч, 7, 15, 30, 60 и 90 сут после внутривенного введения нечеловекообразным обезьянам [30]. Обнаружено, что наночастицы аккумулируются предпочтительно в легких, печени и почках. Наблюдалась нормальная активность печени и почек, и наночастицы, стабилизированные DMSA, рассматриваются как биосовместимый наноматериал для использования в биомедицинских целях.

Исследовали [31] токсичность образцов магнитной жидкости, содержащей наночастицы γ-Fe₂O₃, поверхность которых была покрыта DMSA, лимонной или лауриновой кислотой, по отношению к клеткам линии SK-MEL-37 (меланомы человека). Цитотоксичность в условиях *in vitro* определяли с применением бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (тест МТТ). Покрытые DMSA наночастицы не оказывают видимого токсического воздействия на клетки в ингибирующей концентрации (IC₅₀, ингибирование на 50 %) выше 2260 мкг железа/мл,

в то время как IC_{50} для наночастиц магемита, покрытых лауриновой и лимонной кислотой, составляет 254 и 433 мкг железа/мл соответственно. Методом просвечивающей электронной микроскопии показано, что исследуемые наночастицы поглощаются клетками посредством эндоцитоза с образованием эндоцитозных везикул. Клетки, подвергнутые воздействию наночастиц магемита, покрытых лауриновой кислотой, в высоких концентрациях (588 или 840 мкг железа/мл), проявляют морфологические признаки апоптоза.

Покрытые лауриновой кислотой наночастицы магнетита обладают меньшей цитосовместимостью, и их поглощение клетками (фибробластами) более интенсивное по сравнению с наночастицами магнетита, покрытыми декстраном [32].

С целью отделения микроорганизмов от культуральной среды с применением энергии магнитного поля магнитные частицы конъюгировали с полимером [33]. Из четырех методов приготовления конъюгатов магнетит-полимер (МП) – спаривания аminosилана, спаривания глицидилсилана, поперечного соединения и ко-преципитации – использование частиц МП, приготовленных методом ко-преципитации приводит к наибольшему извлечению клеток и высокой диспергируемости. Среди различных катионных, анионных и неионных полимеров, используемых для приготовления конъюгатов МП и магнитной сепарации *E. coli*, при использовании магнетита, конъюгированного с хитозаном (МХ), наблюдается наибольшее извлечение клеток. Количество клеток *E. coli*, адсорбирующих МХ, составляет около 1 г сухих клеток на 1 г МХ, извлечение клеток при приложении магнитного поля свыше 90 % достигается в широком диапазоне pH – от 3,0 до 7,0. Из 12 протестированных микроорганизмов, для 4 извлечение составляло свыше 90 %, количества адсорбированных микроорганизмов превышали 0,5 г сухих клеток на 1 г МХ. Различия в величинах адсорбции объясняются, главным образом, различными ζ -потенциалами протестированных микроорганизмов.

Некоторые особенности взаимодействия наночастиц с клетками

Показано [10], что гетеровзаимодействие микроорганизмов *S. aureus* с коллоидным магнетитом при концентрации частиц $10^4 - 10^5$ на один микроб приводит к гибели микроорганизма. На основе учета капиллярных и термофлуктуационных эффектов рассчитаны упругие натяжения в мембране микроба, окруженного псевдооживленным магнитным слоем, приводящие к ее разрушению. Отмечено, что для микробов *E. coli*, *Ps. aeruginosa* эффект гибели при гетеровзаимодействии с коллоидным магнетитом не наблюдается.

Для изучения взаимодействия дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* с магнитными наночастицами хлебопекарские дрожжи инкубировали с магнитной жидкостью на основе магнетита, стабилизированной хлорной кислотой и имеющей низкий pH, и нагревали либо до инкубации с магнетитом, либо после нее. В результате получали различные картины взаимодействия при наблюдении методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии [34].

Если клетки нагревали перед инкубацией с магнитной жидкостью, частицы Fe_3O_4 поглощались клетками в очень малом количестве, а большое их количество обнаруживалось на поверхности клеток, что обуславливало их агрегацию и шероховатость клеточной поверхности. Если клетки сначала инкубировали с магнитной жидкостью, затем нагревали, то на микрофотографиях, полученных методом сканирующей электронной микроскопии, наблюдали гладкую клеточную поверхность, а изображения, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии, указывали на присутствие незначительного количества магнитных наночастиц на клеточной поверхности и огромного их количества – внутри клеток, причем

большинство наночастиц было обнаружено в периплазматическом пространстве (между клеточной стенкой и плазматической мембраной), и малое количество наночастиц находилось в цитоплазме.

Полученные результаты указывают на то, что поглощение клетками магнитных наночастиц – активный, а не пассивный процесс. При нагревании клеток в температурном режиме, оптимальном для их размножения, сначала количество клеток не возрастает (латентная фаза), затем резко увеличивается (экспоненциальная фаза роста), при этом происходит ускорение клеточных функций, включая способность к эндоцитозу. В процессе эндоцитоза магнитные наночастицы способны проникать в большом количестве через клеточную стенку, но не плазматическую мембрану, которая обладает большей селективностью [34].

Подобные результаты были получены авторами [35] при исследовании поглощения наночастиц оксида железа клетками мозга (астроцитами). Методом электронной микроскопии показано, что после нагревания до 37 °С наночастицы присутствовали внутри клеток, в отличие от выдержки астроцитов и наночастиц при 4 °С, в результате которой поглощения клетками оксида железа не наблюдалось.

Взаимодействие наночастиц Fe^0 и оксидов железа с бактериальными клетками *Escherichia coli* изучали методом просвечивающей электронной микроскопии [17]. На клеточной стенке бактерий наблюдали внешнюю оболочку с высокой электронной плотностью, соответствующую слою наночастиц, адсорбированных на поверхности клеток. Признаков включения наночастиц в клетки не обнаружено. Наблюдалось изменение формы наночастиц Fe^0 после инкубации с бактериями. В то время как первоначальные наночастицы Fe^0 были псевдосферическими перед контактом с *E. coli*, они преобразовывались в ламеллярную структуру после инкубации в течение 1 ч. Изменения формы наночастиц магемита или магнетита методом просвечивающей электронной микроскопии обнаружено не было. Изучение структурной эволюции наночастиц на основе железа, проведенное методами рентгеновской дифракции и рентгеновской абсорбции вблизи краевой структуры, показало, что наночастицы Fe^0 , наиболее чувствительные к окислению как в абиотическом, так и в биотическом окружении в аэробных условиях, преобразуются в процессе окисления в частицы магнетита и планкообразные частицы лепидокроцита ($\gamma Fe^{III} OOH$). Показано, что в абиотической суспензии частицы $\gamma FeOOH$ являются главным продуктом окисления наночастиц Fe^0 , в то время как частицы Fe_3O_4 преобладают в присутствии бактерий [17].

Для исследования морфологических изменений бактерий *E. coli* после их взаимодействия с наночастицами магнетита использовалась методика полуконтактной атомной силовой микроскопии. У бактерий, выращенных в среде с наночастицами, было отмечено существенное увеличение шероховатости поверхности клеточной стенки, а также значительное уменьшение количества пилей и флагелл [36].

С целью максимального увеличения адгезии клеток при поддержке их жизнеспособности, поверхность кантилевера, изготовленного из нитрида кремния, функционализировали 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES), что приводило к покрытию поверхности группами аminosилана [37]. Клетки *Shewanella* хорошо прикрепляются к кантилеверам, обработанным таким способом, а сила взаимодействия клетка – кантилевер имеет величину, достаточную для предотвращения открепления клеток в ходе экспериментов с поверхностями оксида железа. Положительные знаки приписываются силам отталкивания, а отрицательные – силам притяжения.

Кантилеверы, к которым были прикреплены клетки, проявляли совершенно иную картину взаимодействия с поверхностями оксида железа, чем функционализированные APTES кантилеверы без прикрепленных клеток. При сближении притяжение между функционализированными APTES кантилеверами и

тремя поверхностями минерала больше, чем между поверхностями минерала и кантилеверами с иммобилизованными клетками. На двух поверхностях магнетита сетевой эффект клеток состоит в уменьшении притяжения, так что малые силы отталкивания можно измерить на очень коротких расстояниях между объектами. Наибольшая сила отталкивания наблюдается на поверхности магнетита (111), меньшее отталкивание – на поверхности магнетита (100). В системе бактерия – гематит (001) не наблюдается максимума отталкивания при сближении, но притяжение немного уменьшено в присутствии клеток по сравнению с силами, измеряемыми при использовании функционализированного APTES кантилевера [37].

Силы взаимодействия между клетками *Shewanella oneidensis* MR-1 и поверхностями магнетита и гематита, рассчитанные на основе классической теории Дерягина–Лившица–Вервея–Овербека (DLVO) [38], качественно похожи на профили, измеренные методом атомной силовой микроскопии (рис. 5). Однако величины сил, рассчитанные на основе теории DLVO, значительно отличаются от значений, измеренных методом атомной силовой микроскопии, на малых расстояниях между объектами. Это согласуется с предположением, что теория DLVO не может точно предсказывать кривые сил взаимодействия на очень малых расстояниях.

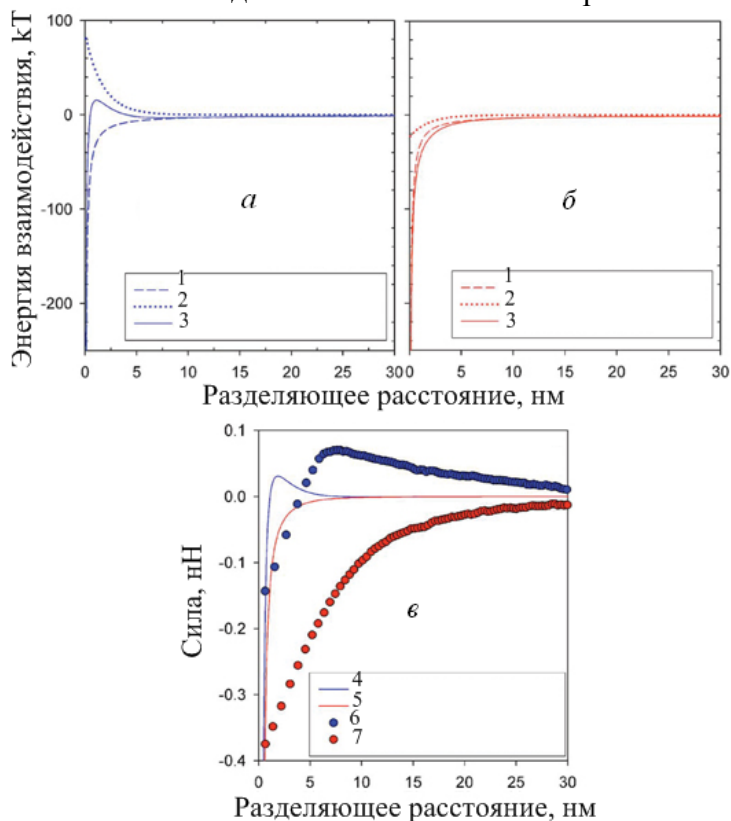


Рис. 5. Энергия взаимодействия между клетками *S. oneidensis* MR-1 и поверхностями магнетита (а) и гематита (б) в соответствии с теорией DLVO; кривые взаимодействия (при сближении) клеток MR-1, иммобилизованных на кантилеверах Si_3N_4 , функционализированных APTES, с поверхностями магнетита и гематита, по данным атомной силовой микроскопии (в): 1 – энергия взаимодействия ван-дер-Ваальса; 2 – энергия электростатического взаимодействия; 3 – энергия взаимодействия DLVO; 4 – сила взаимодействия DLVO с магнетитом; 5 – сила взаимодействия DLVO с гематитом; 6 – измеренная сила взаимодействия с гранью магнетита (100); 7 – измеренная сила взаимодействия с гранью гематита (001).

При $\text{pH} \sim 7,0$ клетки *Shewanella oneidensis* имеют отрицательный заряд, обусловленный присутствием групп $-\text{COO}^-$ на наружной клеточной поверхности. Изoeлектрическую точку (pH_{pzc}) определяли методом кислотно-основного титрования. Различия в концентрации групп, сообщаемых заряд, объясняются особенностями приготовления, температурой, составом раствора, присутствием дефектов и адсорбатов. Величина pH_{pzc} объемного магнетита составляла $6,6 \pm 0,4$, а объемного гематита – около $8,3 \pm 0,9$. Для грани гематита (001) это значение составляло $\sim 8,5$. Из этих данных следует, что при $\text{pH} 7$ грань гематита будет заряжена положительно, в то время как грани магнетита могут иметь небольшой отрицательный заряд. Грани гематита (001) не только имели наибольшую силу адгезии клеток, но и наибольшую клеточную плотность и скорость переноса электронов с внутренней клеточной мембраны через периплазматическое пространство и наружную мембрану к нерастворимым соединениям Fe(III) – конечному акцептору электронов.

Механизм, согласно которому восстанавливающие металл бактерии прикрепляются к поверхностям минералов оксида железа, остается невыясненным. Однако установлено, что наблюдаемые различия в силе адгезии клеток *Shewanella oneidensis* находятся в зависимости от присутствия на поверхности минералов трехвалентного железа и типа граней кристаллической решетки оксида железа. Экспериментальные данные свидетельствуют, что и электростатические, и гидрофобные взаимодействия определяют не только величину силы адгезии, но и характер прикрепления и рост клеточных популяций [39]. Неясно, обусловлен ли очевидный эффект увеличения адгезии клеток при повышении плотности сайтов трехвалентного железа исключительно электростатическим механизмом взаимодействия, или за этот процесс ответственно специфическое распознавание трехвалентного железа. Поскольку на внешней клеточной мембране расположены восстановители трехвалентного железа (цитохромы), прикрепление клеток может быть обусловлено специфическими взаимодействиями [37].

На рис. 6 показана зависимость относительного количества (%) бактерий, прикрепленных к Fe_3O_4 , от условий окружающей среды. Наблюдались незначительные различия в интенсивности прикрепления клеток в аэробных и анаэробных условиях, но в обоих случаях количество прикрепленных клеток не превышало 15 %. Исключение составляло прикрепление клеток в диапазоне $\text{pH} 2-4$ в анаэробной среде и при наличии ионов PO_4^{3-} , адсорбированных на поверхности магнетита (интенсивность прикрепления повышалась до 45 %), что, очевидно, связано с образованием приповерхностных комплексов FePO_4^{3-} . Прикрепление было преимущественно необратимым, что свидетельствовало о преобладании гидрофобных или химических взаимодействий над электростатическим отталкиванием [40].

Активированные эндотелиальные клетки – привлекательная мишень для специфичной доставки лекарственных препаратов с использованием магнитных носителей, содержащих лекарственный препарат. От силы взаимодействия таких наноструктур с мишенью зависит биораспределение носителей, длительность их пребывания в кровеносной системе организма и эффективность достижения эндотелиальных клеток. Было рассчитано взаимодействие (адгезия/фагоцитоз) в условиях *in vitro* между эндотелиальными клетками человека и частицами магнетита после нанесения поверхностных покрытий различной степени гидрофильности и величины поверхностного заряда. Адгезия почти не наблюдалась (около 1 % или меньше) для трех из пяти типов частиц с покрытиями декстраном, полиэтиленгликолем с замещенной карбоксильной группой и кремнеземом с октадецильными группами [$\text{Si}(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$].

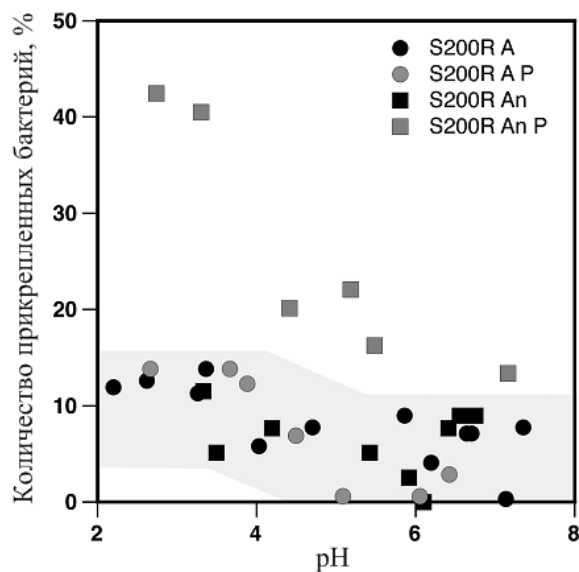


Рис. 6. Относительное количество клеток микроорганизмов *Shewanella putrefaciens* 200R, выращенных в аэробных (S200R A) и анаэробных (S200R An) условиях, и прикрепленных к поверхности магнетита или магнетита с адсорбированными ионами PO_4^{3-} (S200R A P; S200R An P). Выделенная область изображает относительное количество клеток с учетом погрешности измерений (5 %) для S200R A, S200R A P и S200R An.

Напротив, частицы, покрытые функционализированным карбоксильными группами декстраном и полиэтиленгликолем, подвергались адгезии или фагоцитозу в значительной степени (58 и 26 % соответственно). Эти результаты были получены измерением магнитной восприимчивости различных фракций клеточных культур при определении концентрации магнитных частиц и подтверждены методами просвечивающей электронной микроскопии. Для исследований разработан измеритель магнитной восприимчивости жидких образцов или частиц в суспензии, обладающий высокой чувствительностью, простотой использования, процесс измерения составляет несколько секунд. В [41] описывается конструкция и особенности работы этого прибора.

Биодеградация наночастиц

Органы человека содержат большое количество эндогенного железа, например в печени – ферритин, в крови – гемоглобин. Однако наночастицы могут иметь бóльшую токсичность, чем железо в молекулярной форме. Поэтому изучение механизмов их природной деградации и удаления из организма способствует внедрению метода мишенеспецифичной доставки лекарственных препаратов в клиническую практику.

Мессбауэровская спектроскопия – один из эффективных методов изучения метаболизма суперпарамагнитных частиц *in vivo*. Этот метод нечувствителен к большинству органических атомов (углерод, водород, кислород, азот и др.) и позволяет производить разделение спектральных вкладов от экзогенного железа, содержащегося в виде частиц, и эндогенного железа в белках ферритине или гемоглобине. Более того, мессбауэровская спектроскопия относится к набору частиц как к системе взаимодействующих однодоменных магнитных кластеров и дает информацию о магнитных взаимодействиях между частицами.

После инъекции магнитных наночастиц в виде феррожидкости в хвостовую вену мышей они накапливались преимущественно в их печени и селезенке [42].

Форма мессбауэровских спектров печени мыши после инъекции значительно отличалась от первоначального спектра наночастиц. В частности, кроме компонента магнитного расщепления в спектре печени, соответствующего частицам, наблюдался дополнительный парамагнитный дублет, типичный для немагнитных форм железа, что указывает на наличие процессов деградации инъектированных частиц в организме мышей. Измерения показали, что качественное изменение спектров происходит в течение нескольких часов после инъекции. Такая быстрая трансформация не может объясняться только медленными процессами биodeградации.

Сравнение мессбауэровских спектров первоначальной феррожидкости, мозга крыс перед инъекцией и через три месяца после инъекции указывает на то, что суперпарамагнитный компонент спектра, который расщепляется при низкой температуре, полностью исчезает из спектра. Это свидетельствует об удалении суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 из мозга в течение трех месяцев [19].

Изомерный сдвиг и квадрупольное расщепление в спектрах после инъекции магнитной жидкости в хвостовую вену мышей близки к соответствующим параметрам для ферритина. Следовательно, наблюдаемый дублет может быть связан с образованием железосодержащего белка в процессе биodeградации. Мессбауэровские параметры и средние диаметры наночастиц остаются стабильными с увеличением промежутка времени после инъекции. Единственное изменение – постепенное уменьшение площади компонента спектров, обусловленного наночастицами, что связано с уменьшением концентрации наночастиц. Общая концентрация железа не постоянна, это указывает на удаление железа из печени [43].

Для изучения возможности растворения ультрамалых суперпарамагнитных наночастиц оксида железа в клеточном окружении проводили исследование генерации ионов Fe^{3+} в зависимости от времени и pH (рис. 7).

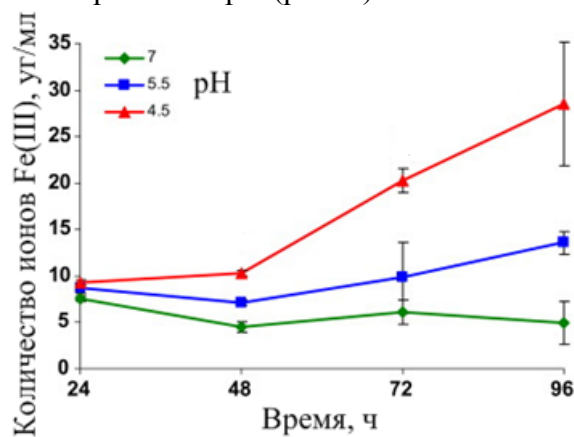


Рис. 7. Влияние pH на генерацию ионов Fe^{3+} покрытыми декстраном ультрамалыми суперпарамагнитными наночастицами оксида железа.

Когда ультрамалые наночастицы оксида железа проникают в клетку посредством эндоцитоза, частицы подвергаются воздействию pH в диапазоне от 7,4 (во внеклеточной среде) до 5,5 в «ранних» и 4,5 в «поздних» эндосомах. Ионы Fe^{3+} , генерируемые внутри содержимого эндосомальной везикулы, потенциально способны к утечке в цитоплазму, где они находятся в виде доступных ионов «лабильного» железа [44].

Проводили сравнение оксидативного повреждения ДНК в зависимости от содержания «лабильного» железа в клетках лимфомы мыши L5178Y линий LY-R и LY-S, различающихся по чувствительности к H_2O_2 [45]. Клетки LY-R, чувствительные к H_2O_2 , содержат в 3 раза большее количество «лабильного» железа, чем устойчивые к H_2O_2

клетки LY-S. Чувствительность клеток LY-R к H₂O₂ отчасти объясняется более высоким содержанием оксидативных повреждений ДНК по сравнению с клетками LY-S.

Полифункциональные наноконпозиты с магнитными свойствами

В Институте химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины разработаны перспективные для практического применения нанотехнологии синтеза, разработаны и синтезированы опытные образцы (табл. 1) новых типов магниточувствительных наноконпозитов, а также магнитных жидкостей на их основе, для медико-биологических применений, изучены и систематизированы их физические, химические и биологические свойства [46–56].

Таблица 1. Синтезированные и исследованные экспериментальные образцы

Магниточувствительные полифункциональные наноконпозиты	Биофункционализованные магниточувствительные наноконпозиты	Биофункционализованные магнитные жидкости
Fe ₃ O ₄ /ПАА	Fe ₃ O ₄ /ПАА/Ig	Fe ₃ O ₄ /ол. Na
Fe ₃ O ₄ /γ-АПС	Fe ₃ O ₄ /γ-АПС/Ig	Fe ₃ O ₄ /ол. Na/ЦП
Fe ₃ O ₄ /ГА	Fe ₃ O ₄ /ГА/Ig	Fe ₃ O ₄ /ол. Na/ПЭГ
Fe ₃ O ₄ /ГА-Ag	Fe ₃ O ₄ /ГА-Ag/Ig	Fe ₃ O ₄ /ол. Na/ПЭГ/ЦП
Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	Fe ₃ O ₄ /γ-АПС/CD-95	Fe ₃ O ₄ /ГА/ДР
Fe ₃ O ₄ /TiO ₂	Fe ₃ O ₄ /γ-АПС/ЦП/CD-95	Fe ₃ O ₄ /ДМСК
Fe ₃ O ₄ /Al ₂ O ₃	Fe ₃ O ₄ /ПАА/CD-95	Fe ₃ O ₄ /Gd ₂ O ₃ /ол. Na
Fe ₃ O ₄ /Al(OH) ₃	Fe ₃ O ₄ /ПАА /ЦП/CD-95	Fe ₃ O ₄ /Gd ₂ O ₃ /ол. Na/ПЭГ
Fe ₃ O ₄ /Gd ₂ O ₃	Fe ₃ O ₄ /ГА/CD-95	Fe ₃ O ₄ /ДМСК/КБ
Gd _x Fe _{3-x} O ₄	Fe ₃ O ₄ /ГА/ЦП/CD-95	Fe ₃ O ₄ /ДМСК/SMCC/Ig
	Fe ₃ O ₄ /ГА/ДР	Fe ₃ O ₄ /ГА/ДР

ПАА – полиакриламид; γ-АПС – γ-аминопропилсилоксан; ГА – гидроксипатит; Ig – иммуноглобулины; CD-95 – антитела; ЦП – цисплатин; ДР – доксорубин; ол. Na – олеат натрия; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ДМСК – димеркаптосукциновая кислота; КБ – карборан, В, Gd-содержащие соединения; SMCC-спейсерная молекула сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (sulfo-SMCC).

Проведены теоретические оценки условий транспорта и фиксации магниточувствительных наноконпозитов (носителей лекарственных препаратов) при помощи внешнего магнитного поля. Показано, что при оптимальном выборе магнитных систем можно достичь удерживания наноконтейнеров с лекарством даже в больших магистральных кровеносных сосудах. Проведенные расчеты и вычисленные уровни градиентов показывают реальную возможность целевой доставки и удерживания магнитных носителей в органах-мишенях [46, 50].

Исследование цитотоксического эффекта наноконпозитов проведено в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. Изучено цитотоксическое воздействие магниточувствительных наноконпозитов с адсорбированным цитостатиком, конъюгированных моноклональным антителом, на жизнеспособность клеточной линии карциномы молочной железы человека MCF-7 [50]. Исследованиями показано, что использование магнитных наноконпозитов, в состав которых входит противоопухолевый препарат и моноклональное антитело CD-95, сопровождалось значительным синергическим эффектом цитотоксического действия. Их эффективность

на 20 – 200 % превышала совместное действие соответствующих контрольных доз препаратов цисплатина и антитела. Так, обнаружено, что эффективность наноконструктов $Fe_3O_4/PAAC/CD-95$ и $Fe_3O_4/GA/CD-95$, в состав которых входили противоопухолевый препарат ЦП и моноклональное антитело CD-95, в 1,5 – 2 раза превышала общее цитотоксическое действие соответствующих контрольных доз.

Наличие синергического эффекта воздействия биологически активных компонентов наноконструктов объясняется, во-первых, осуществлением адресной доставки магниточувствительным носителем комплекса «цитостатик – ориентированное моноклональное антитело» к опухолевым клеткам вследствие распознавания на их поверхности соответствующих рецепторов. При этом травматическое действие наноразмерного носителя на клеточную мембрану существенно повышает проникновение лекарственного препарата через мембранный барьер. Во-вторых, оптимизированная система лиганд – рецептор играет важную роль в апоптозе злокачественных клеток: связываясь с соответствующим рецептором, антитело запускает иммунотерапевтический механизм, который приводит к апоптозу.

Таким образом, показано, что использование магниточувствительных полифункциональных наноконструктов, в состав которых входит противоопухолевый препарат и моноклональное антитело, позволяет реализовать распознавание специфических клеток и достичь цитотоксического эффекта при более низких концентрациях лекарственных препаратов, уменьшая при этом токсико-аллергическое воздействие химиотерапевтического препарата на организм в целом [50].

Литературные данные, касающиеся строения и функций природных наноструктур, особенностей наномеханизмов биологических процессов, протекающих в них, а также физико-химических и биологических свойств и областей применения биомиметических материалов, рассмотрены в [57].

В [58] обобщены результаты исследований в области нанофармакологии, исторические этапы и перспективы их развития.

Заключение

Многие живые организмы в процессе биохимических реакций синтезируют биогенный магнетит и другие соединения железа с магнитными свойствами. Природа происхождения и физиологические функции биогенных ферритов в многоклеточных организмах до настоящего времени до конца не изучены, хотя известно, что многие нейрологические болезни сопровождаются изменением количества магнитных наночастиц в тканях.

Использование магнитных частиц позволяет решить многие биотехнологические задачи, например разделение клеточных смесей, выделение антител и др. Меченые магнитными наночастицами клетки могут использоваться в медицине в связи с их способностью накапливаться в зоне повреждения кровеносных сосудов и сердца, опухолевом очаге. Магниточувствительные наноконструкты (наноконтейнеры с лекарством) могут удерживаться магнитным полем даже в больших кровеносных сосудах. Поскольку наночастицы обладают высокой реакционной активностью и способностью к диффузии сквозь биологические мембраны, преодолению тканевых барьеров, они могут оказывать токсическое воздействие на клетки при ослаблении функций основных компонентов клеточной структуры, таких как митохондрии, ядро и ДНК. Повреждающее воздействие наночастиц на клетки зависит от многих факторов: химического состава, концентрации, времени экспозиции и т.п.

Оксиды железа обладают слабой цитотоксичностью, однако при сохранении жизнеспособности, клетки могут содержать поврежденные ДНК и митохондрии. Поэтому при медицинских, биологических и биотехнологических применениях, во

избежание повреждения и гибели клеток, наночастицы оксида железа рекомендуется покрывать слоем модифицирующего биосовместимого компонента.

Литература

1. Schübbe S., Würdemann C., Peplies J., Heyen U., Wawer C., Glöckner F.O., Schüler D. Transcriptional organization and regulation of magnetosome operons in *Magnetospirillum gryphiswaldense* // *Appl. and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72, N 9. – P. 5757–5765.
2. Биогенный магнетит и магниторецепция. Новое о биомagnetизме / Дж. Киршвинк, Д. Джонс, Б. Мак-Фадден (Ред.) – Москва: Мир, 1989. – Т. 2. – 525 с.
3. Schultheiss-Grassi P.P., Heller F., Dobson J. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver // *BioMetals*. – 1997. – V. 10. – P. 351–355.
4. Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J. Magnetite biomineralization in the human brain // *PNAS*. – 1992. – V. 89, N 16. – P. 7683–7687.
5. Gorobets S.V., Gorobets O.Yu. Functions of biogenic magnetic nanoparticles in organisms // *Functional materials*. – 2012. – V. 19, N 1. – P. 18–26.
6. Quintana C., Bellefquih S., Laval J.Y., Guerquin-Kern J.L., Wu T.D., Avila J., Ferrer I., Arranz R., Patiño C. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level // *J. Struct. Biol.* – 2006. – V. 153, N 1. – P. 42–54.
7. Fuller M., Dobson J., Wieser H.G., Moser S. On the sensitivity of the human brain to magnetic fields: evocation of epileptiform activity // *Brain Res. Bull.* – 1995. – V. 36, N 2. – P. 155–159.
8. Schultheiss-Grassi P.P., Dobson J. Magnetic analysis of human brain tissue // *BioMetals*. – 1999. – V. 12. – P.67–72.
9. Hautot D., Pankhurst Q.A., Khan N., Dobson J. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue // *Proceedings of the royal society B*. – 2003. – V. 270, N 1. – P. 62–64.
10. Вольтер Е.Р. Биофизико-химические аспекты получения и применения коллоидов магнетита: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02. – Сухум, 2005. – 119 с.
11. Rivière C., Boudghène F.P., Gazeau F., Roger J., Pons J.N., Laissy J.P., Allaire E., Michel J.B., Letourneur D., Deux J.F. Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation // *Radiology*. – 2005. – V. 235, N 3. – P. 959–967.
12. Leeper N.J., Hunter A.L., Cooke J.P. Stem cell therapy for vascular regeneration: Adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells // *Circulation*. – 2010. – V. 122. – P. 517–526.
13. Loebinger M.R., Kyrtatos P.G., Turmaine M., Price A.N., Pankhurst Q., Lythgoe M.F., Janes S.M. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles // *Cancer Res*. – 2009. – V. 69, N 23. – P. 8862–8867.
14. Heymer A., Haddad D., Weber M., Gbureck U., Jakob P.M., Eulert J., Nöth U. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29, I. 10. – P. 1473–1483.

15. Singh N., Jenkins G.J.S., Asadi R., Doak S.H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) // *Nano Rev.* – 2010. – V. 1. – P. 1–15.
16. Auffan M., Rose J., Wiesner M.R., Bottero J.-Y. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity *in vitro* // *Environmental Pollution.* – 2009. – V. 157, I. 4. – P. 1127–1133.
17. Auffan M., Achouak W., Rose J., Roncato M.A., Chanéac C., Waite D.T., Masion A., Woicik J.C., Wiesner M.R., Bottero J.Y. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli* // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – V. 42, N 17. – P. 6730–6735.
18. *Nanoethics and Nanotoxicology* / P. Houdy, M. Lahmani, F. Marano (Eds.) – Paris: Éditions Bélin, 2010. – 1st Edition. – 2011, XLIII, 620 p.
19. Polikarpov D.M., Gabbasov R.R., Cherepanov V.M., Chuev M.A., Korshunov V.A., Nikitin M.P., Deyev S.M., Panchenko V.Y. Biodegradation of magnetic nanoparticles in rat brain studied by mössbauer spectroscopy // *IEEE Transactions on magnetics.* – 2013. – V. 49, N 1. – P. 1–4.
20. Freyria F.S., Bonelli B., Tomatis M., Ghiazza M., Gazzano E., Ghigo D., Garrone E., Fubini B. Hematite nanoparticles larger than 90 nm show no sign of toxicity in terms of lactate dehydrogenase release, nitric oxide generation, apoptosis, and comet assay in murine alveolar macrophages and human lung epithelial cells // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – V. 25, N 4. – P. 850–861.
21. Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size // *Toxicology Letters.* – 2009. – V. 188, I. 2. – P. 112–118.
22. Könczöl M., Ebeling S., Goldenberg E., Treude F., Gminski R., Giere R., Grobéty B., Rothen-Rutishauser B., Merfort I., Mersch-Sundermann V. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: Role of ROS, JNK and NF- κ B // *Chem. Res. Toxicol.* – 2011. – V. 24, N 9. – P. 1460–1475.
23. Lunov O., Syrovets T., Büchele B., Jiang X., Röcker C., Tron K., Nienhaus G.U., Walther P., Mailänder V., Landfester K., Simmet T. The effect of carboxydextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis in human macrophages // *Biomaterials.* – 2010. – V. 31, I. 19. – P. 5063–5071.
24. Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison G., Curtis A.S.G. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization // *Biomaterials.* – 2004. – V. 25. – P. 5405–5413.
25. Naqvi S., Samim M., Abdin M.Z., Ahmed F.J., Maitra A.N., Prashant C.K., Dinda A.K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress // *Int. J. Nanomedicine.* – 2010. – V. 5. – P. 983–989.
26. Ankamwar B., Lai T.C., Huang J.H., Liu R.S., Hsiao M., Chen C.H., Hwu Y.K. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells // *Nanotechnology.* – 2010. – V. 21, N 7.
27. Villanueva A., Cañete M., Roca A.G., Calero M., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C.J., Morales M. del Puerto, Miranda R. The influence of surface functionalization on

- the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells // Nanotechnology. – 2009. – V. 20, N 11.
28. Liu Y.X., Chen Z.P., Wang J.K. Internalization of DMSA-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles into mouse macrophage cells // Advanced Materials Research. – 2012. – V. 455-456. – P. 1221–1227.
 29. Auffan M., Decome L., Rose J., Orsiere T., De Meo M., Briois V., Chaneac C., Olivi L., Berge-Lefranc J.-L., Botta A., Wiesner M.R., Bottero J.-Y. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxicity study // Environ. Sci. Technol. – 2006. – V. 40, N 14. – P. 4367–4373.
 30. Monge-Fuentes V., Garcia M.P., Tavares M.C.H., Valois C.R.A., Lima E.C.D., Teixeira D.S., Morais P.C., Tomaz C., Azevedo R.B. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus spp.*) // Nanomedicine. – 2011. – V. 6, N 9. – P. 1529–1544.
 31. de Freitas E.R.L., Soares P.R.O., de Paula Santos R., dos Santos R.L., da Silva J.R., Porfirio E.P., Bão S.N., de Oliveira Lima E.C., Morais P.C., Guillo L.A. In vitro biological activities of anionic γ -Fe₂O₃ nanoparticles on human melanoma cells // J. of Nanoscience and Nanotechnology. – 2008. – V. 8, N 5. – P. 2385–2391.
 32. Pradhan P., Giri J., Banerjee R., Bellare J., Bahadur D. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles // J. of Magnetism and Magnetic Materials. – 2007. – V. 311, I. 1. – P. 282–287.
 33. Honda H., Kawabe A., Shinkai M., Kobayashi T. Development of chitosan-conjugated magnetite for magnetic cell separation // J. of Fermentation and Bioengineering. – 1998. – V. 86, I. 2. – P. 191–196.
 34. Azevedo R.B., Silva L.P., Lemos A.P.C., Bao S.N., Lacava Z.G.M., Safarik I., Safarikova M., Morais P.C. Morphological study of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with magnetic fluid // IEEE Transactions on Magnetics. – 2003. – V. 39, I. 5. – P. 2660–2662.
 35. Geppert M., Hohnholt M.C., Thiel K., Nürnberger S., Grunwald I., Rezwani K., Dringen R. Uptake of dimercaptosuccinate-coated magnetic iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes // Nanotechnology. – 2011. – V. 22, N 14.
 36. Николаева Е.В., Шишкин Е.И., Шур В.Я. Взаимодействие наночастиц магнетита с биологическими клетками. Исследование методами сканирующей зондовой микроскопии // Третья международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» (16-18 июня, 2009, Москва, Россия, физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). – С. 43.
 37. Neal A.L., Bank T.L., Hochella M.F., Rosso K.M. Cell adhesion of *Shewanella oneidensis* to iron oxide minerals: Effect of different single crystal faces // Geochem Trans. – 2005. – V. 6, N 4. – P. 77.
 38. van Oss C.J. Interfacial Forces in Aqueous Media. – New York: Marcel Dekker, 1994. – 440 p.
 39. Caccavo F. Protein-mediated adhesion of the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY to hydrous ferric oxide // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65, N 11. – P. 5017–5022.

40. Roberts J.A., Fowle D.A., Hughes B.T., Kulczycki E. Attachment behavior of *Shewanella putrefaciens* onto magnetite under aerobic and anaerobic conditions // *Geomicrobiology J.* – 2006. – V. 23. – P. 631–640.
41. Ström V., Hultenby K., Grüttner C., Teller J., Xu B., Holgersson J. A novel and rapid method for quantification of magnetic nanoparticle–cell interactions using a desktop susceptometer // *Nanotechnology.* – 2004. – V. 15, N 5. – P. 457.
42. Gabbasov R.R., Cherepanov V.M., Chuev M.A., Polikarpov D.M., Panchenko V.Y. Study of interparticle interaction in conjugates of magnetic nanoparticles injected into mice // *Hyperfine interact.* – 2012. – V. 206. – P. 71–74.
43. Gabbasov R.R., Cherepanov V.M., Chuev M.A., Polikarpov D.M., Nikitin M.P., Deyev S.M., Panchenko V.Y. Biodegradation of magnetic nanoparticles in mouse liver from combined analysis of mössbauer and magnetization data // *IEEE Transactions on magnetics.* – 2013. – V. 49, N 1. – P. 1–4.
44. Singh N., Jenkins G.J.S., Nelson B.C., Marquis B.J., Maffei T.G.G., Brown A.P., Williams P.M., Wright C.J., Doak S.H. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles // *Biomaterials.* – 2012. – V. 33, I. 1. – P. 163–170.
45. Kruszewski M., Iwaneńko T. Labile iron pool correlates with iron content in the nucleus and the formation of oxidative DNA damage in mouse lymphoma L5178Y cell lines // *Acta Biochim. Pol.* – 2003. – V. 50, N 1. – P. 211–215.
46. Фізико-хімія наноматеріалів і супрамолекулярних структур / А.П. Шпак, П.П. Горбик (Ред.) – Київ: Наукова думка, 2007. – Т. 1. – 428 с.
47. *Nanomaterials and Supramolecular Structures. Physics Chemistry, and Applications* / A.P. Shpak, P.P. Gorbyk (Eds.) – Springer Netherlands, 2009. – P. 63.
48. Горбик П.П., Чехун В.Ф., Шпак А.П. Наноструктурні матеріали - отримання, властивості, застосування. – Мінськ: Беларуска навука, 2009. – С. 131.
49. Пат. 86322 Україна, МПК (2009) А61К 9/51, 33/26, 47/48. Нанокapsула з функціями наноробота / Горбик П.П., Петрановська А.Л., Усов Д.Г., Сторожук Л.П. – Опубл. 10.04.09. Бюл. №7.
50. Горбик П.П., Туров В.В. Наноматеріали і нанокomпозити в медицині, біології, екології / А.П. Шпак, В.Ф. Чехун (Ред.) – Київ: Наукова думка, 2011. – 444 с.
51. Горбик П.П., Горобець С.В., Турелик М.П., Чехун В.Ф., Шпак А.П. Біофункціоналізація наноматеріалів і нанокomпозитів. Навчальний посібник. – Київ: Наукова думка, 2011. – 283 с.
52. Пат. 99211 Україна, МПК А61К 9/51, А61Р 35/00, 47/02, 39/44, 45/06 (2006.01). Нанокapsула з функціями наноробота / Горбик П.П., Петрановська А.Л., Турелик М.П. та ін. – Опубл. 25.07.12. Бюл. № 14.
53. Горбик П.П., Петрановська А.Л., Турелик М.П. та ін. Свідоцтво № 46056 на ТТР (технологічний регламент) на виробництво речовини «Магнетит У» (7.09.2012).
54. Пат. 78473 Україна, МПК H01F 1/28, А61К 47/02, C01G 49/08 (2006.01). Магнітна протипухлинна рідина / Патон Б.Є., Горбик П.П., Петрановська А.Л. та ін. – Опубл. 25.03.2013. Бюл. № 6.

55. Пат. 78448 Україна, МПК Н01F 1/28, С01G 49/08 (2006.01). Магнітна рідина / Горбик П.П., Петрановська А.Л., Турелик М.П. та ін. – Опубл. 25.03.2013. Бюл. № 6.
56. Горбик П.П., Турелик М.П., Горобець С.В., Горобець О.Ю., Дем'яненко І.В. Біофункціоналізовані наноматеріали і наноккомпозити: наукові основи та напрями застосування. Навчальний посібник (електронне видання НМУ № Е 12/13-090). – Київ: НТТУ (КП), 2013. – 480 с.
57. Чекман І.С., Сімонов П.В. Природні наноструктури та наномеханізми. – Київ: Задруга, 2012. – 104 с.
58. Чекман І.С. Нанофармакологія. – Київ: Задруга, 2011. – 424 с.

ВЗАЄМОДІЯ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК З КЛІТИНАМИ

С.П. Туранська, А.П. Кусяк, В.В. Туров, П.П. Горбик

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ 03164, Україна*

*Виконано огляд робіт по дослідженню впливу на живі клітини нанорозмірних магнітних частинок, умов надання їм біосумісності та областей використання. Наводяться дані щодо механізмів цитотоксичності, її залежності від хімічного складу, розмірів, концентрації наночастинок, типу захисного покриття, а також біодеградації наноматеріалів в умовах *in vivo* та *in vitro*.*

INTERACTION OF MAGNETIC NANOPARTICLES WITH CELLS

S.P. Turanska, A.P. Kusyak, V.V. Turov, P.P. Gorbyk

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine*

*The review of articles has been carried out on the study of dependency onto living cells of the nano-sized magnetic particles, the conditions of getting them biocompatible, the application areas. The data are cited about mechanisms of cytotoxicity, its dependence on chemical composition, the sizes, concentration of nanoparticles, the type of protective cover, and also the biodegradation of nanomaterials *in vivo* and *in vitro*.*