



ЧЕХУН

Василь Федорович – академік НАН України, доктор медичних наук, професор, директор Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ НАНОТЕХНОЛОГІЙ У БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ

За матеріалами наукової доповіді
на засіданні Президії НАН України
29 квітня 2015 року

Наведено основні результати ряду унікальних комплексних досліджень і технологічних розробок, що не лише розкривають механізми взаємодії нанорозмірних систем, а й створюють практичну платформу для впровадження нових підходів діагностики і терапії в клінічну практику.

Ключові слова: нанокompозити, пухлинні клітини, векторна доставка ліків, лікарська резистентність.

У сучасних умовах глобалізованого суспільства найважливіший фактор розвитку країни — конкурентоздатність на світовій арені — можна забезпечити лише своєчасним впровадженням інноваційних технологій. За багатьма прогнозами, обрис XXI ст. визначатимуть нанотехнології, які є рушійною силою нової науково-технічної революції, що приведе до істотних змін у багатьох галузях виробництва та медицини, і дають підстави для глибшого розуміння загальнобіологічних та еволюційних процесів. Створення біосумісних наноструктурованих матеріалів для потреб медицини належить до найбільш пріоритетних сфер людської діяльності, що дасть змогу забезпечити потреби ринку високоспецифічними і безпечними імплантатами, квантовими люмінофорами, векторними системами доставки ліків, магнітної томографії тощо. Навчившись маніпулювати атомами і молекулами, наука виводить людство на орбіту нових можливостей у боротьбі з найпоширенішими хворобами та відтермінуванні процесів старіння.

Хочеться вірити, що нанотехнології розширять наші горизонти у сучасній молекулярній діагностиці, в терапії, адже наносвіт — це унікальна царина окремих атомів і молекул, де панують закони квантової та молекулярної біології, які зумовлюють колективну поведінку трильйонів атомів і визначають

об'ємні та функціональні властивості будівельних блоків різних видів матерії. Однак, не відкидаючи оптимізму щодо швидкого впровадження нанотехнологій у практику, варто зазначити, що багато складних завдань ще залишаються невирішеними.

У процесі розвитку та реалізації сучасної нанотехнологічної науки постають питання, які стосуються особливостей біосумісності ультрамалих частинок, їх розподілу в органах і тканинах, виведення цих агентів з організму та прояву токсичних ефектів (рис. 1). Пошук відповідей на ці питання слід розглядати як основу нової дисципліни — нанотоксикології.

Актуальність поставлених завдань та координація науково-методичного потенціалу

Нанотехнології — це відносно молода галузь інтегральної науки, яка завдяки тісній міждисциплінарній співпраці широкого кола фахівців дала поштовх до створення унікальних засобів для потреб біології та медицини. Їх впровадження становить основу сучасного прогресу в діагностиці й терапії найпоширеніших хвороб, у тому числі і злоякісних новоутворень. Так, застосування квантових міток дає змогу візуалізувати та диференціювати патологічні

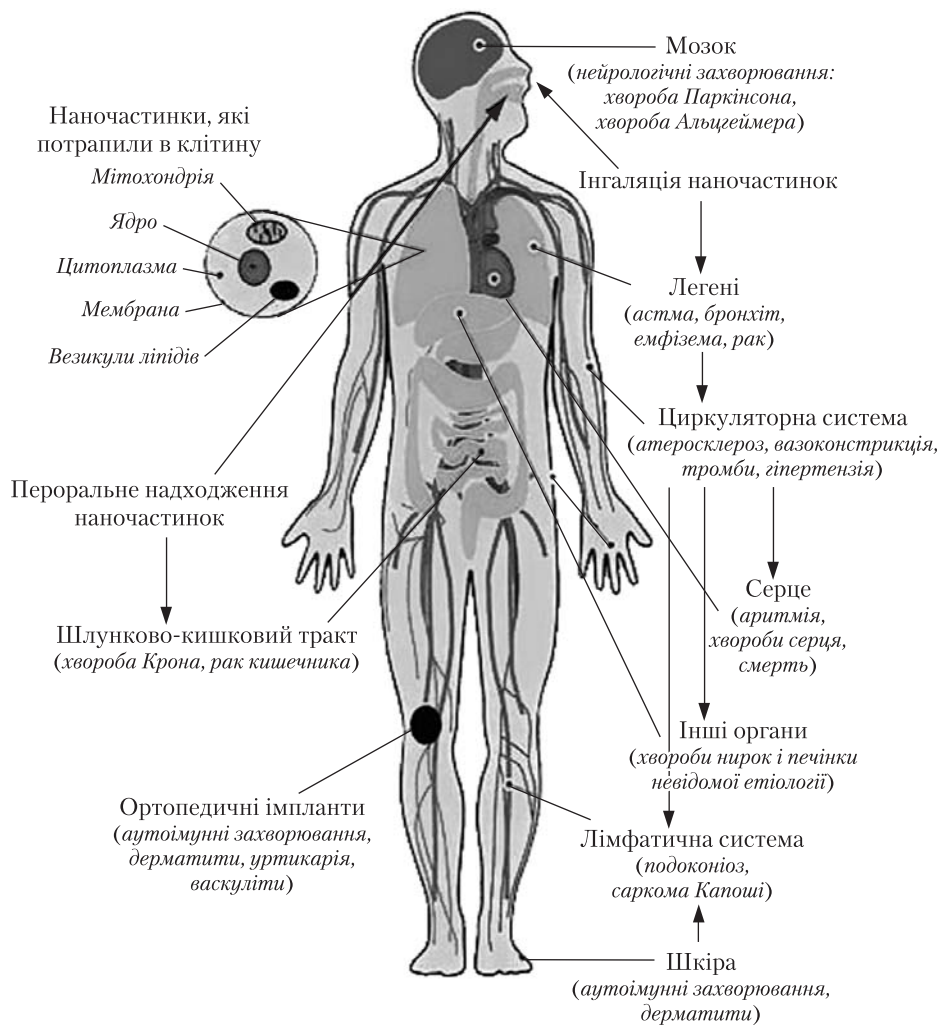


Рис. 1. Хвороби, пов'язані з впливом наночастинок

вогнища на початкових стадіях їх зародження. У лабораторній діагностиці з'являється можливість детектувати в тисячі разів меншу кількість білка, ДНК, вірусів порівняно з традиційними технологіями.

Останнім часом дедалі частіше розглядають можливості використання наносполук як векторних систем цільової доставки терапевтичних засобів. У рамках виконання постанови Президії НАН України «Про наукову та науково-організаційну діяльність Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України» від 26.12.2007 № 350 та під час реалізації Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали», цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій» отримано монодисперсні наночастинки золота, магнетиту, оксидів інших елементів з керованими оптичними і магнітними характеристиками, які здатні вибірково накопичуватися в пухлинних вогнищах та утворювати наноконплеси з цитостатиками. Створено нові стабільні лікарські форми наноконполиту на основі магнетиту, колоїдного золота, оксидів інших елементів і цитостатика в біосумісній матриці для магнітокерованої доставки його в пухлину. Досліджено фізико-хімічні властивості отриманих наноконполитів на різних етапах приготування відповідно до розроблених технологій та фармакопейних вимог.

Створено систему апаратного забезпечення й еталонних зразків для метрологічного контролю наноконполитів. Змодельовано процеси транспорту магнітних наноконполитів до пухлини по судинах крові та розраховано параметри магнітів для їх концентрування, розподілу температури в пухлині при гіпертермії, що дозволяє істотно підвищити ефективність променевої і хіміотерапії онкологічних хворих.

Досліджено біологічну і специфічну активність наноконполитів у модельних системах *in vitro* та *in vivo* з урахуванням особливостей їх фармакокінетики. Вивчено ефективність

фотодинамічної терапії пухлин із застосуванням як фотосенсибілізатора наноконполитів порфірину з наночастинками золота. Уперше встановлено, що висока активність цих наноконполитів зумовлена переважанням у механізмі їх протипухлинної дії ролі синглетного кисню.

Розроблено методику визначення рівня продукції та накопичення вільних радикалів унаслідок впливу на клітину нанорозмірних матеріалів за допомогою люмінолзалежної хемілюмінесценції. Отримані з використанням цього методу дані збігаються з результатами цитоморфологічних досліджень, що дозволяє стверджувати про релевантність хемілюмінесцентного методу щодо характеристики цитотоксичної дії наноконполитних матеріалів різного походження.

Визначено комплексну систему цитоморфологічних, імуноцитохімічних, біофізичних та інших маркерів для тестування дії наночастинок, що ґрунтується на визначенні рівня пошкодження та репарації ДНК, стану глутатіонзалежної системи детоксикації ксенобіотиків і змін активності та посттрансляційної модифікації ферменту ксантиноксидоредуктази.

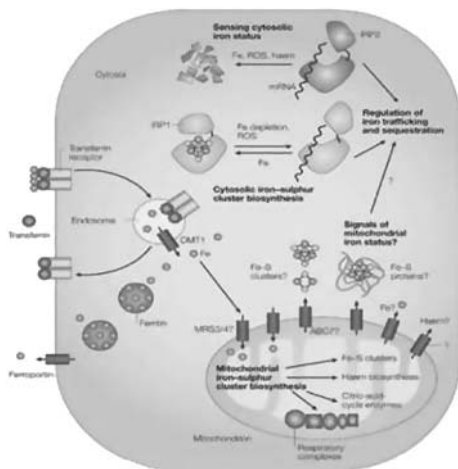
Загалом до реалізації зазначених завдань залучено 11 установ НАН України, два національних університети і дві зарубіжні установи, науковці яких опублікували понад 500 статей, 12 монографій, отримали близько 100 патентів України, видали 5 методичних рекомендацій.

Перспективи фундаментального та прикладного значення отриманих результатів

На сьогодні феромагнітні наночастинки є одним із найцікавіших нанотехнологічних матеріалів, який досить широко застосовують у різних галузях народного господарства.

Ідея використання заліза та різних форм оксидів у вирішенні актуальних проблем медицини, зокрема онкології, не нова, оскільки залізо належить до есенціальних мікроелементів, які забезпечують функціонування живих організмів. Однак лише в останнє десятиріч-

**КЛІТИННИЙ МЕТАБОЛІЗМ
ЗАЛІЗА**



Tracey A. Rouault
2005

**РОДИНА ЗАЛІЗОВМІСНИХ
БІЛКІВ**

Гемопоетини

Гемоглобін, міоглобін,
цитохроми, цитохромоксидаза,
гемогентизатоксидаза,
пероксидаза, мієлопероксидаза,
каталаза

Залізофлавопротеїни

Цитохром-с-редуктаза,
сукцинатдегідрогеназа,
НАДФ-оксидаза
(в гранулоцитах), ацил-S-КоА-
дегідрогеназа, ксантиноксидаза,
пролілгідроксилаза

Залізов'язуючі білки

Трансферин, феритин, феропортин,
лактоферин, гемосидерин, мобілферин та ін.

Рис. 2. Залізо — незамінний мікроелемент, життєво необхідний для організму людини

чя з'явилися методи застосування новітніх наноматеріалів на основі Fe та засобів їх доставки і локалізації в патологічному вогнищі. Особливого змісту це питання набуває в разі створення штучних нанорозмірних матеріалів з новими фізико-хімічними та біологічними властивостями.

Ендогенне залізо — невід'ємна функціонально активна частина кожної живої клітини, що зумовлює його важливу роль у відтворенні багатьох процесів життєдіяльності в організмі людини і тварин. Завдяки високій хімічній активності залізо є одним із ключових елементів життя, відіграє важливу роль у процесах росту і поділу клітин, забезпеченні функції дихання, синтезу ДНК і загибелі клітини. Розмаїття біологічних функцій організму, в яких бере участь залізо, робить його однією з ключових ланок у патогенезі цілої низки захворювань, у тому числі онкологічних (рис. 2). Це покладає на дослідників велику відповідальність, адже вперше свідомо відбувається «схрещування» однорозмірних елементів живої і рукотворної природи.

Функціонування біологічних систем, зокрема організму людини і навіть окремої клітини,

є таким складним і універсальним явищем, що навіть століття наукових пошуків не дали вичерпних знань щодо виникнення та функціонування живих систем і їх патологічних станів. Тому вивчення детальної структури і функцій складових цього процесу на рівні клітини і організму було і залишається актуальним.

Дослідження взаємодії штучних і природних нанорозмірних систем у відповідному просторі відкриє нові таємниці зародження життя та можливості оптимальної корекції проявів його різних форм. Адже результати наших попередніх досліджень дають змогу переглянути й доповнити, здавалося б, застарілу теорію Опаріна—Холдейна щодо походження життя. Згідно з цією теорією, процеси, що привели до виникнення життя на Землі, можна поділити на три етапи: виникнення органічних речовин; виникнення білків; виникнення білкових тіл. Однак про роль і місце іонів заліза як елементів Великого вибуху і постійного магнітного поля Землі (магнітних бур) у ній не згадується. Проте, за нашими попередніми даними, саме ці важливі елементи могли бути основним фактором і каталізатором синтезу та інтеграції в процесі утворення білкових тіл.

Так, для того щоб довести, наскільки значущими і функціонально важливими є наночастинки заліза, в рамках комплексного проекту «Взаємодія наноструктурних матеріалів з нормальними та пухлинними клітинами, розробка методів доставки, безпека їх використання» було проведено дослідження щодо їх взаємовпливу із сироватковим альбуміном. Методом диференціальної сканувальної мікрокалориметрії встановлено, що акцепція функціоналізованих наночастинок магнетиту молекулами сироваткового альбуміну людини (САЛ) відбувається в другому домені білкової глобули. При цьому їх взаємодія з альбуміном, а також комплексування з САЛ наночастинок золота, вуглецевих нанотрубок та фулеренів супроводжується значними змінами нативної архітектури білкової глобули. Показано, що синтезовані на основі САЛ наносфери з різним ступенем перехресної зшивки демонструють підвищену акцепторну активність щодо клітинних мембран злоякісних клітин та значно більшу транспортну ємність відносно речовин гідрофобної і гідрофільної природи порівняно з нативним альбуміном. Інкорпоровані в наносфери наночастинки магнетиту повністю зберігають свої природні теплопровідні, електропровідні та магнітні властивості, що свідчить про перспективність їх застосування в гіпертермії та векторній терапії хворих на злоякісні новоутворення. Розуміння молекулярних основ утворення залізо-альбумінових комплексів може не лише сприяти створенню нового покоління структурно стабільних наночастинок Fe_3O_4 , а й поповнити базу сучасних знань щодо механізму взаємодії органічних і неорганічних сполук. Такий підхід дав змогу дослідити певні конформаційні зміни в білку за участю наночастинок заліза, які найбільшою мірою проявляються під дією магнітного поля. Саме тоді й відбувається агрегація цього білкового комплексу, і він стає функціонально значущою білковою структурою, що логічно вписується в зазначену вище теорію зародження життя на Землі.

Разом з тим, до кінця зрозуміти поведінку складних систем надзвичайно важко. Хоча з

упевненістю можна сказати, що після взаємодії вони починають поводити себе як єдине ціле з проявом певних властивостей. За наявності дієвих способів керування станом цих структурованих форм можна як активувати, так і суттєво сповільнювати процеси метаболізму і нормальних, і трансформованих клітин.

Водночас результати фундаментальних досліджень останніх років відродили інтерес до вивчення ролі, яку відіграє обмін ендogenous заліза, і засвідчили його значення у пухлинному процесі, що дозволяє розглядати цей мікроелемент як перспективний маркер і мішень для лікування пацієнтів зі злоякісною патологією. В організмі метаболізм заліза відбувається за допомогою низки залізовмісних білків, які є фізіологічно активними внутрішньоклітинними регуляторами. Тому визначення змін залізовмісних комплексів у тканинах організму у відповідь на введення екзогенного заліза у складі біополімерних нанокомпозитів і механізмів, які лежать в їх основі, — це важливі питання, що відкривають перспективу спрямованої модифікації такої відповіді в заданому напрямі.

Особливий інтерес ці дослідження становлять у контексті раку молочної залози, оскільки гормональний статус жінки тісно асоційований зі значними коливаннями вмісту заліза в організмі. Як дефіцит заліза, так і його надлишок можуть мати негативні наслідки для організму в цілому. Поряд із цим є дані, що свідчать про синергізм порушень метаболізму заліза та естрогенів при виникненні раку молочної залози.

У процесі злоякісної трансформації надлишок заліза сприяє утворенню активних форм кисню, які спричинюють ушкодження ДНК. При цьому естроген може бути додатковим субстратом цих реакцій завдяки приєднанню гідроксильної групи і утворенню катехолестрогену — одного з чинників гормонального канцерогенезу.

Численні дослідження останніх років доводять роль порушень обміну ендogenous заліза і активних форм кисню в реалізації цитотоксичних ефектів багатьох протипухлинних пре-

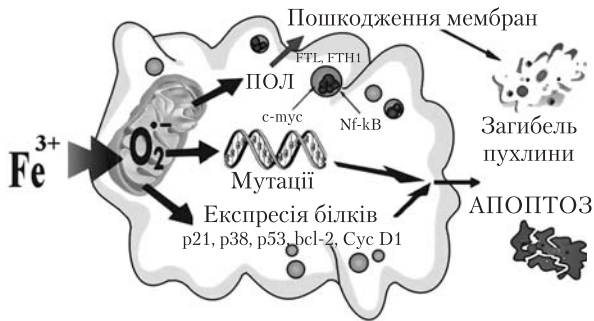


Рис. 3. Інтегральна схема цитотоксичного ефекту феромагнітних наночастинок на пухлинні клітини

паратів, у тому числі паклітакселу, цисплатину, етопозиду, доксорубіцину. Можливість такого підходу до лікування онкологічних хворих показано у деяких експериментальних роботах і підтверджено результатами наших власних досліджень [1–3] (рис. 3).

Так, уперше встановлено, що одним з важливих механізмів формування резистентності до протипухлинних препаратів є порушення регуляції металовмісних білків та обміну ендogenous заліза [2]. Показано, що в пухлинних клітинах, резистентних як до цисплатину, так

і доксорубіцину, спостерігається гіперметилування промотора гена рецептора трансферину I, а також зміни рівня білків — регуляторів обміну ендogenous заліза (рецептор трансферину, трансферин, легкі та важкі ланцюги феритину, феропортин і гепсидин). Отримані дані свідчать, що одним із механізмів формування медикаментозної резистентності до різних за механізмом дії протипухлинних препаратів є порушення обміну заліза на рівні метилування генів — регуляторів обміну заліза. Крім того, ми встановили, що цілеспрямоване інгібування білка легкого ланцюга феритину мікроРНК miR-133a збільшує чутливість клітин MCF-7/DOX і MCF-7/CP до доксорубіцину та цисплатину (рис. 4).

У системі *in vitro* встановлено, що наслідком дії наноконструкції (наночастинок феромагнітику + цисплатин) на чутливі й резистентні клітини лінії MCF-7 є істотні зміни експресії білків і мікроРНК, які беруть участь у регуляції апоптозу, інвазії, адгезії та метастазуванні. Показано, що в механізмах реалізації апоптичної програми під впливом наноконструкції важливу роль відіграють порушення гомеостазу

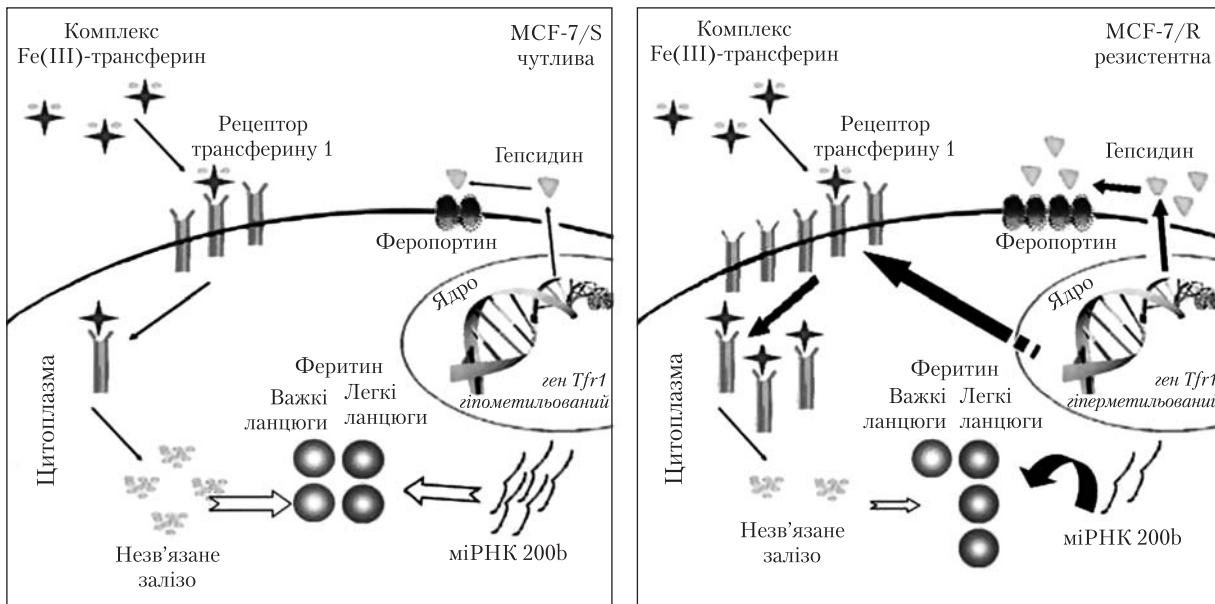


Рис. 4. Схематичне зображення особливостей обміну ендogenous заліза в чутливих (а) і резистентних (б) клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7

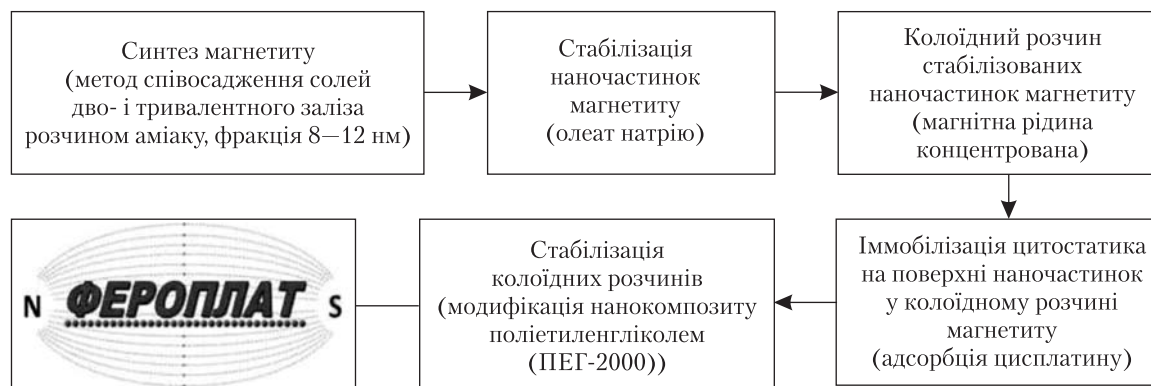


Рис. 5. Розроблена технологія одержання нової лікарської форми — «Фероплат»

ендогенного заліза. Зокрема, наслідком впливу наноконцентрату є зміни метилування та експресії рецептора трансферину, трансферину, легких і важких ланцюгів феритину, які найбільш виражені в клітинах резистентної лінії і призводять до активації утворення вільних радикалів та оксидативного стресу [4, 5].

Отримані результати стали підґрунтям для розроблення і патентування способу верифікації цитотоксичних ефектів наноферомагнетиків (патент № 75163), способу оцінки біологічної активності наноферомагнетиків (патент № 82350) та способу визначення змін активних форм кисню під впливом наноферомагнетиків (патент № 89196).

На основі вивчення ультраструктурних ефектів взаємодії нанорозмірних комплексів з компонентами цитоскелета чутливих і резистентних пухлинних клітин ми встановили, що стабілізоване залізо надходить у клітини досліджуваних ліній за допомогою рецепторопосередкованого ендоцитозу і в різні часові інтервали визначається в лізосомах і фагосомах з електроннощільним вмістом, що є свідченням лізосомального шляху метаболізму оксиду заліза [4].

У клінічних дослідженнях виявлено зв'язок рівня феритину в сироватці крові та пухлинній тканині з чутливістю до неоад'ювантної хіміотерапії у хворих на рак грудної залози [3]. Показано, що високий рівень феритину в сироватці крові та пухлинній тканині свідчить про резистентність хворих на рак молочної залози

до неоад'ювантної хіміотерапії. Отже, показники рівня феритину можна використовувати як об'єктивний критерій визначення чутливості раку молочної залози до неоад'ювантної хіміотерапії як на рівні організму, так і на рівні пухлини (патенти № 106148 і 84044 «Спосіб прогнозування чутливості до неоад'ювантної терапії у хворих на рак молочної залози»).

Встановлено також роль білків обміну ендogenous заліза у формуванні молекулярних підтипів раку молочної залози. Показано, що найвищий рівень експресії феритину та гепсидину спостерігається в пухлинах хворих на рак молочної залози базального підтипу, якому притаманний агресивний перебіг і низька чутливість до протипухлинної терапії. Отримані дані можуть допомогти в розробленні нових діагностичних критеріїв та вдосконаленні існуючих схем протипухлинного лікування з урахуванням рівня експресії феритину і гепсидину в клітинах раку молочної залози певного молекулярного підтипу.

На основі великого комплексу проведених робіт науковці академічних установ уперше розробили новий вітчизняний протипухлинний препарат «Фероплат», що містить наночастинки магнітної рідини та цисплатин (рис. 5). Доклінічні дослідження довели, що за показниками протипухлинної та антиметастатичної дії «Фероплат» не лише не поступається офіційному препарату «Цисплатин», а й перевершує його, особливо при резистентних формах злоякісних новоутворень. На основі

цієї наукової розробки видано методичні рекомендації «Критерії та методи оцінки біологічної безпеки металовмісних наноматеріалів при створенні протипухлинних векторних систем» (2014), затверджені двома експертними комісіями МОЗ України та НАМН України «Фармакологія» і «Онкологія».

Отже, залучення сучасного нанотехнологічного інструментарію сприяє започаткуванню якісно нового етапу у вирішенні ключових проблем біології та медицини. Створення інноваційних лікарських засобів спонукало до розроблення нових систем їх доставки. В останні десятиліття галузь контрольованої доставки ліків стала одним із найперспективніших напрямів наукових досліджень [6].

Результати комплексних досліджень і технологічні розробки, отримані під час виконання науково-технічних проектів, розкривають механізми взаємодії нанорозмірних систем, збагачуючи наші уявлення про загальнобіологічні процеси, а також створюють практичну платформу для впровадження нових підходів діагностики і лікування хворих на злоякісні новоутворення.

Варто зазначити, що на сьогодні понад 25% світового ринку лікарських засобів займають ліки з удосконаленою системою доставки, додатково функціоналізованими компонентами

та специфічними флуоресцентними мітками. Розроблена нами векторна система не лише забезпечує цільову доставку, а й дозволяє вирішити проблему подолання природних бар'єрів організму до набутої резистентності.

Ера нанотехнологій по-справжньому увійшла в реальне життя: матеріалознавці, фізики, хіміки, біологи, медики навчилися оперувати об'єктами одного й того самого наномасштабу, спілкуючись при цьому «однією мовою». Науковці та суспільство сподіваються, що ця мова виявиться зрозумілою й тим, від кого залежить подальша доля реалізації перспективних вітчизняних наукових розробок.

Насамкінець хочу висловити подяку нашим партнерам з академічних інститутів: електрозварювання ім. Є.О. Патона, електродинаміки, проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича, фізики, металофізики ім. Г.В. Курдюмова, хімії поверхні ім. О.О. Чуйка, загальної і неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського, біохімії ім. О.В. Палладіна, біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка, НТК «Інститут монокристалів», а також із Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Національного технічного університету України «КПІ», Національного центру токсикологічних досліджень (National Center for Toxicological Research, USA).

REFERENCES

1. Shpyleva S.I., Tryndyak V.P., Kovalchuk O., Starlard-Davenport A., Chekhun V.F., Beland F.A., Pogribny I.P. Role of ferritin alterations in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. **126**(1): 63–71.
2. Chekhun V.F., Lukyanova N.Yu., Burlaka A.P., Bezdenezhnykh N.A., Shpyleva S.I., Tryndyak V.P., Beland F.A., Pogribny I.P. Iron metabolism disturbances in the MCF-7 human breast cancer cells with acquired resistance to doxorubicin and cisplatin. *Int. J. Oncology.* 2013. **43**(5): 1481–86.
3. Antipova S.V., Shepil O.V., Lukianova N.Yu., Chekhun V.F. Relations between serum and tumor ferritin concentrations with sensitivity to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Oncology (Onkologiya)*. 2013. **15**(3): 204–09 (in Ukrainian). http://www.oncology.kiev.ua/pdf/15_3/204.pdf. [Антіпова С.В., Шепіль О.В., Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф. Зв'язок рівня феритину в сироватці крові та пухлинній тканині з чутливістю до неoad'ювантної хімотерапії у хворих на рак молочної залози. *Онкологія*. 2013. Т. 15, № 3. С. 204–209].
4. Chekhun V., Lukianova N., Demash D., Borikun T., Chekhun S., Shvets Yu. Manifestation of key molecular genetic markers in pharmacocorrection of endogenous iron metabolism in MCF-7 and MCF-7/DDP human breast cancer cells. *CellBio.* 2013. **3**(4): 217–27.
5. Chekhun V.F., Yurchenko O.V., Naleskina L.A., Demash D.V., Lukianova N.Yu., Lozovska Yu.V. In vitro modification of cisplatin cytotoxicity with magnetic fluid. *Experimental oncology.* 2013. **35**(1): 15–19.
6. Park K., Mrsny R.J. Controlled Drug Delivery: Present and Future. *Controlled Drug Delivery.* 2000. **752**: 2–12.

В.Ф. Чехун

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

СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ НАНОТЕХНОЛОГИЙ
В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

По материалам научного доклада на заседании Президиума НАН Украины,
29 апреля 2015 г.

Изложены основные результаты ряда уникальных комплексных исследований и технологических разработок, не только раскрывающих механизмы взаимодействия наноразмерных систем, но и создающих практическую платформу для внедрения в клиническую практику новых подходов диагностики и терапии.

Ключевые слова: нанокompозиты, опухолевые клетки, векторная доставка лекарств, лекарственная резистентность.

V.F. Chekhun

Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology
of NAS of Ukraine
45 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

STATE AND PROSPECTS OF IMPLEMENTATION NANOTECHNOLOGY
IN BIOLOGY AND MEDICINE

Information from scientific report at the meeting of Presidium of NAS of Ukraine,
April 29, 2015

The main results of a number of unique complex researches and technology developments, which reveal not only the mechanisms of interaction of nanodimensional systems, but also create the platform for practical implementation of new diagnostic and therapeutic approaches into clinical practice, are presented.

Keywords: nanocomposites, tumor cells, vector delivery of drugs, drug resistance.