

УДК 54.057+547.311+576.5+577+615.9+616-006

ДІЯ ДОКСОРУБІЦИНУ, ДОСТАВЛЕНОГО В ПУХЛИННІ КЛІТИНИ *in vitro* ТА *in vivo* НОВИМ НАНОРОЗМІРНИМ ФУНКЦІОНАЛЬНИМ ОЛІГОЕЛЕКТРОЛІТНИМ НОСІЄМ

Н. М. Бойко¹
Ю. В. Сеньків^{1,3}
Є. А. Шляхтіна^{1,3}
О. В. Ключівська¹
Н. Р. Скорохід¹
Н. Є. Міміна²
Т. В. Скорохода²
М. М. Москвін²
О. С. Заїченко²
Р. С. Стойка^{1,3}

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів, Україна

²Національний університет «Львівська політехніка», Україна

³Львівський національний університет імені Івана Франка,
Україна

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Отримано 13.12.2012

Одним із головних завдань сучасної біофармацевтики є розроблення нових нанорозмірних носіїв з низькою токсичністю, заданим розміром, регульованим відгуком на локальні та віддалені впливи, можливостями візуалізації дії ліків і результатів діагностики. У цій роботі використовували новий олігомерний носій ВА-МАНГ-МП для доставлення протипухлинного препарату доксорубіцину в пухлинні клітини різних ліній. Синтезований олігомерний носій було додатково функціоналізовано фосфатидилхоліном. Показано, що таке доставлення доксорубіцину до клітин-мішеней дає змогу знизити його діючу цитотоксичну дозу в 10 разів порівняно з дозою вільного доксорубіцину за збереження однакового за рівнем антинеопластичного ефекту. Цей дозовий ефект було продемонстровано як *in vitro* на різних пухлинних клітинах ссавців, так й *in vivo* на мишах з експериментальною лімфою NK/Ly. Дія іммобілізованого доксорубіцину супроводжувалась інтенсивнішим, ніж за дії вільного доксорубіцину, утворенням везикул на поверхні клітин-мішеней *in vitro* та міжнуклеосомною фрагментацією їхньої ДНК, а також вищою часткою мертвих клітин в асцитній рідині мишей із лімфою NK/Ly, яким вводили препарат.

Отже, синтезований нанорозмірний носій на основі олігоелектролітів є перспективною системою для доставлення протипухлинних препаратів у клітини-мішені.

Ключові слова: доставлення доксорубіцину, пухлинні клітини, олігоелектроліти, нанорозмірні частинки.

Незважаючи на значний прогрес у галузі біології та молекулярної генетики пухлин, а також діагностики і профілактики онкологічних захворювань проблему лікування раку ще не вирішено. Головними перешкодами є пізні діагностування пухлини, неадекватні стратегії боротьби з метастазами, швидкий розвиток резистентності пухлин до хіміотерапевтичних препаратів, а також негативні побічні ефекти, характерні для дії більшості з них. Встановлено, що упродовж одного року застосування хіміотерапевтичного лікування хворих на рак від третини до половини клітин пухлин набувають резистентності до первинної цитотоксичної дії різних протипухлинних препаратів [1]. Одним із головних механізмів, що лежать в

основі цього явища, є функціонування систем мембранного транспорту клітини, які можуть забезпечувати множинну стійкість до ліків (MDR — multidrug resistance) [2]. Тому розроблення нових ліків, здатних діяти на ці клітини з резистентністю до найбільш вживаних протипухлинних препаратів (зокрема доксорубіцину, цисплатину, вінкристину, таксолу), а також різноманітних систем (наночастинки, міцелярні полімери тощо) адресного доставлення цих препаратів є пріоритетними завданнями біотехнології та фармацевтичної промисловості.

Нові нанорозмірні багатофункціональні носії протипухлинних препаратів викликають навіть більше зацікавлення, ніж самі ці

препарати природного чи синтетичного походження, що мають достатньо високий антинеопластичний потенціал. Особливий інтерес становлять біосумісні та біодеградабельні полімери, що утворюють нанорозмірні частинки, мають достатньо високу стабільність в організмі, низьку токсичність, адекватний гідрофільно-гідрофобний баланс і завдяки своїй унікальній хімічній структурі можуть бути додатково функціоналізовані для підвищення адресності доставлення іммобілізованих на них ліків до специфічних клітин-мішеней і біомолекул. Використання таких нанорозмірних носіїв уможливує суттєве зниження дози лікарського препарату, що є необхідною для досягнення біологічної дії.

Цьому сприяє й ефект посиленої проникності та затримки (enhanced permeability and retention (EPR) effect) ліків в організмі хворого на рак [3]. Його суть полягає в тому, що час затримки в пухлині протипухлинного препарату, іммобілізованого на наночастинці, є суттєво більшим, ніж час затримки вільного препарату, який швидко виводиться з організму і тому перестає діяти. Полегшеному надходженню наночастинок, навантажених лікувальним препаратом, у пухлину сприяють також особливості будови стінки кровоносних судин поблизу пухлини, що є менш щільними порівняно зі стінкою судин у нормальній тканині чи органі [3]. Отже, завдяки EPR ефективність дії протипухлинного препарату, введеного в організм у складі наночастинки, є істотно вищим, ніж ефективність цього самого препарату у вільному стані.

Відомим нанокомпозитом (діаметр частинки – 100 нм), який вже використовують у клініці для доставлення протипухлинного препарату, є доксил (Doxil), що являє собою функціоналізовану поліетиленгліколем ліпосому з інкапсульованим доксорубіцином [4]. У літературі описано низку синтетичних полімерів, які суттєво посилювали біологічну дію доксорубіцину *in vitro* та *in vivo* [4, 5]. Однак недоліком як доксилу, так і описаних полімерних носіїв є складність подальшої функціоналізації ліпосом для підвищення адресності дії інкапсульованого протипухлинного препарату. Крім того, багато з описаних полімерних наноносіїв самі є досить токсичними, що гальмує швидке впровадження їх у клінічну практику.

У роботі описано використання нових біосумісних функціональних олігоелектролітів, розміри, реакційна здатність і функціональні властивості яких можуть бути

керованими й адаптованими для доставлення лікарських препаратів. Показано, що іммобілізація доксорубіцину на синтезованому нанорозмірному носіїві суттєво підсилює антинеопластичну дію останнього як *in vitro*, так й *in vivo*. Проаналізовано деякі механізми, що можуть лежати в основі такої підсилення дії доксорубіцину.

Матеріали і методи

Створення олігомерних носіїв як системи доставлення лікарських препаратів. Олігоелектролітний носій (далі ОeН), який застосовували в цій роботі, було розроблено і синтезовано науково-дослідною групою кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» під керівництвом к. х. н. О. С. Заїченка [6]. Він є коолігомером вінілацетату (ВА) та малеїнового ангідриду (МАНГ) із кінцевим фрагментом 1-ізопропіл-4-[1-(*трет*-бутилперокси)-1-метилетил]бензену (монопероксин, МП) і одержаний радикальною полімеризацією в середовищі етилацетату при 70 °С, ініційованою N,N'-азоізобутиронітрилом. На рис. 1 показано загальну структуру використаного у цій роботі.

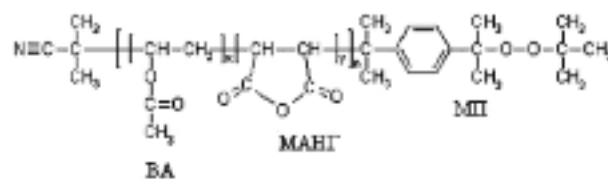


Рис. 1. Схематична структура синтезованого олігоелектролітного носія

Синтезований олігоелектроліт характеризується низькою ($M_n = 3500-6300$ г/моль) молекулярною масою і вузьким молекулярно-масовим розподілом, розчинний у воді та полярних органічних розчинниках. Завдяки наявності в молекулі гідрофобного фрагмента монопероксину цей олігоелектроліт у водних розчинах утворює надмолекулярні міцелоподібні структури ($KKM = 0,98-3,77$ ммоль/л).

Для функціоналізації синтезованого олігоелектроліту в органічному розчиннику розчиняли фосфатидилхолін, оліго(ВА-МАНГ-МП) і лікарську субстанцію (в даному разі – доксорубіцин). Одержаний розчин (концентрація лікарського препарату становить $10^{-3}-10^{-4}$ моль/л) додавали, перемішуючи, до водного розчину 0,9%-го хлориду натрію (фізіологічний розчин).

З метою запобігання агрегації молекул функціонализованого олігоелектроліту, а також для підвищення його проникності крізь плазматичну мембрану клітини нами створено високодисперсні системи, які складаються з нанорозмірних частинок, утворених кон'югатами олігоелектроліт–доксорубіцин. Спосіб їх отримання полягає у використанні фосфоліпиду (фосфатидилхолін) як додаткового гідрофобного стабілізатора і модифікатора поверхні наночастинок. Це не лише дає змогу уникнути агрегації кон'югатів у системі, а й забезпечує полегшення їх ендцитозу крізь клітинну фосфоліпідну мембрану внаслідок спорідненості останньої до поверхні нанорозмірних носіїв. Водну емульсію наночастинок з доксорубіцином диспергували ультразвуком протягом 30 с і одержували частинки розміром близько 170 нм (рис. 2).



Рис. 2. Люмінесценція системи оліго(ВА-МАНГ-МП) з доксорубіцином

Про утворення досить міцних комплексів олігоелектроліт–доксорубіцин свідчать результати тонкошарової хроматографії, які не виявили незв'язаного доксорубіцину у системі. На користь цього свідчать також результати аналізу УФ-спектрів кон'югату. Утворення кон'югату може відбуватися в результаті взаємодії карбоксильних груп носія з аміногрупою доксорубіцину, що не спряжена з хромофором і утворює з носієм комплекс сольового типу.

Клітини та їх культивування. У досліджах використовували клітини лінії L1210 гострого лейкозу миші та трансформовані мишачі фібробласти лінії L929 (одержані з колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ). Клітини культивували в середовищі Ігла у модифікації Дульбекко (DMEM, Sigma) із додаванням 10% сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma). Клітини вирощува-

ли в CO₂-інкубаторі при температурі 37 °С, концентрації CO₂ 5% і відносній вологості 95%. Пересів клітин проводили у співвідношенні 1:5 через 2–3 дні.

Дія доксорубіцину та його комплексу з олігомерним носієм. Для порівняння дії вільного доксорубіцину, доксорубіцину на носіїві та вільного носія концентрацію протипухлинного препарату розраховували за вмістом доксорубіцину. У комплексі, який використовували для дослідження антинеопластичної дії іммобілізованого доксорубіцину, співвідношення носія до препарату становило 30:1. Застосовували доксорубіцин (вільний або іммобілізований на носіїві) у концентраціях 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 і 1 мкг/мл. Вільний носій вносили у 30 разів вищій концентрації, що відповідало кількості носія у його комплексах із доксорубіцином. Ефективність дії досліджуваних речовин визначали за динамікою кількості клітин відносно приросту в контролі (клітини без додавання препаратів, 100%).

Експериментальні моделі. Штам лімфоми NK/Ly було надано к. б. н. О. Ю. Придатко з колекції пухлин, перещеплюваних на тваринах в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ). Штам перещеплювали на мишах лінії BALB/C шляхом доочеревинного введення 0,2 мл асцитної рідини з пухлинними клітинами. Тривалість росту асцитної пухлини становила 5–7 днів, а середня тривалість життя тварини-пухлиноносія без препарату — 25 днів. Ріст пухлин контролювали щоденним зважуванням тварин.

Досліджувані препарати розчиняли в 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину і вводили мишам доочеревинно. Уведення лікувальних препаратів здійснювали щодня протягом 8 днів за стандартною схемою лікування лімфом у експериментальних мишей. Спостереження за тваринами і їх зважування проводили до загибелі або повного одужання.

Експерименти на тваринах було проведено згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин (13 листопада 1987 р.) і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (28 березня 2006 р.).

Визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин. Клітини лінії L929 висівали у 24-лункові пластикові планшети (Costar, США) в середовищі DMEM за присутності 10%-сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Через 24 год додавали

досліджувану речовину в різних концентраціях. Клітини лінії L1210 висівали у 96- або 24-лункові планшети. Досліджувану речовину в різних концентраціях додавали відразу після висівання клітин. Підрахунок кількості клітин здійснювали через певні проміжки часу в гемоцитометричній камері Горяєва. Для підрахунку кількості мертвих клітин використовували трипановий синій у кінцевій концентрації 0,01% через 2 хв після його додавання до суспензії клітин.

Флуоресцентна мікроскопія. Використовували мікроскопи Мікмед-2-12 (ЛОМО, РФ) і Люам-2Р (ЛОМО, РФ) для одержання цитоморфологічних фотографій після фарбування клітин флуоресцентними барвниками Hoechst 33342, пропідію йодидом і акридиновим оранжевим [6].

Виділення ДНК клітин та її електрофорез у гелі агарози. ДНК виділяли з культивованих клітин, як описано [7]. Для цього збирали клітини, двічі промивали їх охолодженим забуференим фізрозчином (ЗФР) й осаджували у мікропробірках Еппендорф центрифугуванням протягом 6 хв при 1 500 об/хв. До осаду клітин додавали лізувальний буфер (20 мМ етилендіамінтетраацетат Na – EDTA, Serva, Німеччина), 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, який містив 1% NP-40 (Sigma, США) і обережно ресуспендували протягом 10 с на льодяній бані. Лізувальний буфер додавали з розрахунку 10 мкл на 10^6 клітин. Далі проби центрифугували протягом 5 хв при 5 000 обертів за 1 хв. Надосадову рідину відбирали в чисту пробірку, а осад ще раз ресуспендували в лізувальному буфері та центрифугували упродовж 5 хв при 5 000 об/хв. Надосадові рідини об'єднували і додавали до них 10% SDS (Sigma, США) до кінцевої концентрації 1% та РНКазу А (Sigma, США), розчинену в буфері TE (20 мМ EDTA Na, Serva, Німеччина), 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, до кінцевої концентрації 5 мг/мл та інкубували 2 год при 56 °С. Потім додавали протеїназу К (Sigma, США) до кінцевої концентрації 2,5 мг/мл та інкубували 2 год при 37 °С. Після інкубації до зразків додавали 1/2 об'єму від загального у пробі 10 М ацетату амонію (Sigma, США) і перемішували з 2 об'ємами (від загального у пробі) охолодженого ізопропанолу. Зразки залишали на ніч при -20 °С. ДНК осаджували центрифугуванням протягом 20 хв при 13 000 об/хв, надосадову рідину відкидали, осад промивали 80%-м етиловим спиртом і розчиняли у буфері TE з розрахунку 5–10 мкл на 1 млн. клітин.

Перед проведенням електрофорезу до зразків ДНК додавали буфер для нанесення

(кінцева концентрація: 7% (w/v) сахароза, 0,04% бромфеноловий синій). Зразки вносили в гель з розрахунку ДНК із 5–6 млн. клітин на лунку. ДНК фракціонували електрофорезом в 1% (w/v) гелі агарози (Serva, США), використовуючи трис-ацетатний електродний буфер (буфер ТАЕ: 0,04 М трис-ацетат, pH 8,0, 0,001 М EDTA). Напруга під час електрофорезу становила 5 В/см. Для виявлення ДНК до електродного буфера додавали етидію бромід (кінцева концентрація 2 мкг/мл). Зони ДНК виявляли за їх свіченням в ультрафіолетовому світлі і фотографували через оранжевий світлофільтр цифровою камерою Olympus C4000.

Статистична обробка результатів. Усі досліди на клітинах повторювали тричі з трьома паралельними експериментами в кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината діаграм відповідає середньому значенню M , розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів. Середню квадратичну похибку σ отриманого результату вираховували за величиною середньої похибки m [7]. На рисунках вона позначена біля кожної точки вертикальною лінією, довжина якої відповідає величині σ . Порівняння двох мінливих величин здійснювали на основі показника вірогідності різниці t (критерій Стьюдента). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли ймовірність різниці P була меншою за 0,05.

Результати та обговорення

Як видно з рис. 3, вільний олігоелектролітний носій, що не містить іммобілізованого доксорубіцину, не має суттєвого негативного впливу на ріст клітин лінії L1210 лейкозу миші. Це свідчить про його низьку токсичність щодо клітин досліджуваної лінії. Навіть у великих дозах (30 мкг/мл, що відповідає дозі носія з іммобілізованим доксорубіцином у високій концентрації 1 мкг/мл) вільний носій через 48 год істотно не знижував приріст клітин порівняно з контролем.

За дії комплексу ОеН-Докс на клітини лінії L1210 виявлено значне зменшення приросту клітин відносно контролю, що було найбільш вираженим на 48-му год інкубації. У концентрації 0,005 мкг/мл доксорубіцин, іммобілізований на ОеН, діяв подібно до вільної форми цього препарату в концентрації, що була на 2 порядки вища — 0,5 мкг/мл.

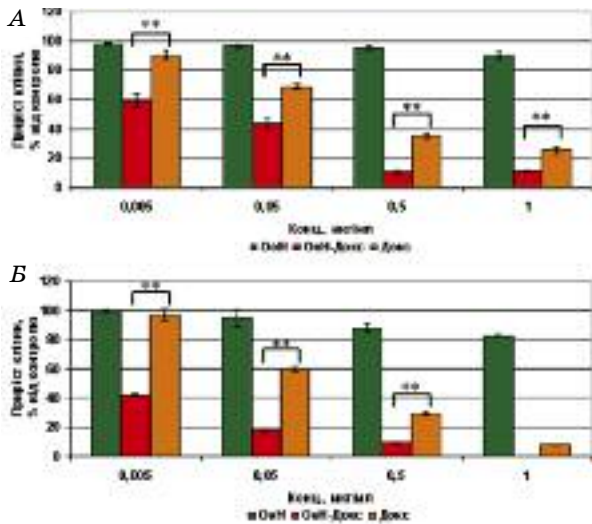


Рис. 3. Динаміка росту клітин лінії L1210 лейкозу миші за дії вільного доксорубіцину, його комплексу на олігоелектролітному носіїві та вільного носія ОеН: протягом 24 (А) та 48 (Б) год (у відсотках відносно контролю, контроль — 100%). * — $P \leq 0,05$; ** — $P \leq 0,01$

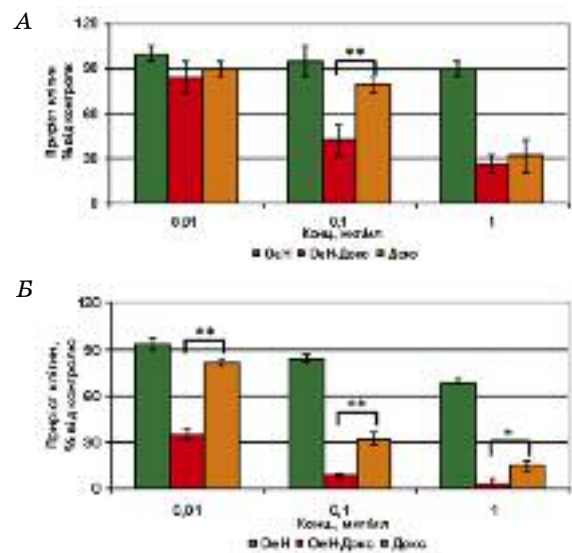


Рис. 4. Динаміка росту клітин лінії L929 (трансформовані фібробласти миші) за дії вільного доксорубіцину, його комплексу на олігоелектролітному носіїві та вільного носія ОеН: протягом 24 (А) та 48 (Б) год (у відсотках відносно контролю, контроль — 100%). * — $P \leq 0,05$; ** — $P \leq 0,01$

У разі використання іншої лінії клітин – трансформованих фібробластів миші L929 для дослідження антинеопластичної дії вільного та іммобілізованого доксорубіцину останній вживали в концентрації 0,01; 0,1; 1 мкг/мл. Вільний носій вносили у концентраціях, що були у 30 разів вищі (рис. 4).

На рис. 4 наведено дані щодо динаміки кількості клітин відносно контролю (100%) через 24 і 48 год. Як видно з рисунка, і на 24-ту, і на 48-му год чітко виражена інгібуюча дія комплексу доксорубіцину з ОеН на трансформовані фібробласти лінії L929. Доксорубіцин у концентрації 0,1 мкг/мл у складі комплексу з носієм пригнічував ріст цих клітин на 24-ту год інкубації аналогічно, а на 48-му год — значно сильніше, ніж вільний доксорубіцин у 10 разів вищій концентрації – 1 мкг/мл (рис. 4, Б).

Руйнування ДНК під час апоптозу у більшості випадків відбувається з утворенням характерних фрагментів, довжина яких кратна довжині однієї нуклеосоми (180–190 пар нуклеотидів). Утворення так званої «драбини ДНК» забезпечують специфічні ендонуклеази, які активуються запущеним у процесі апоптозу каспазним каскадом [8].

Встановлено (рис. 5), що фрагментація ДНК у лейкозних клітинах лінії L1210 за дії доксорубіцину (0,05 мкг/мл), іммобілізованого на олігомерному носіїві ОеН, виражена сильніше, ніж за дії вільного доксорубіцину у цій самій концентрації. Слід зазначити,

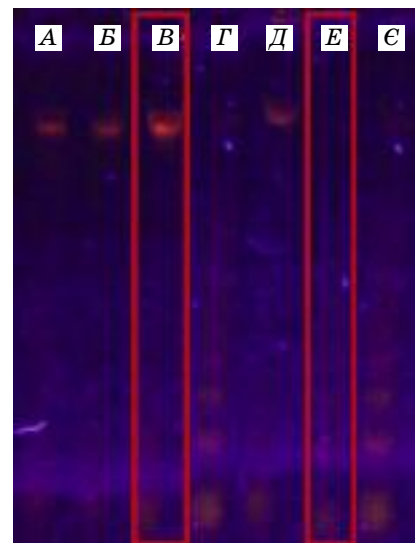


Рис. 5. Електрофореграма ДНК мишачих лейкозних клітин лінії L1210 в гелі 1% -ї агарози: (А — контроль; Б — 0,005 мкг/мл Докс; В — 0,05 мкг/мл Докс; Г — 1 мкг/мл Докс; Д — 0,005 мкг/мл ОеН-Докс; Е — 0,05 мкг/мл ОеН-Докс; Є — 1 мкг/мл ОеН-Докс)

що за дії вільного доксорубіцину на клітини лінії L1210 зберігається значно більша кількість високомолекулярної незруйнованої ДНК, ніж за дії доксорубіцину (у цій самій концентрації), іммобілізованого на носіїві. Це також свідчить про вищу ефективність антинеопластичної дії доксорубіцину, іммобілізованого на олігоелектролітному носіїві,

порівняно з ефективністю дії вільного доксорубіцину.

Фрагментація клітин на везикули є однією із цитоморфологічних ознак апоптозу, і цей процес може завершуватися цілковитою фрагментацією клітини до так званих апоптичних тілець, оточених плазматичною мембраною [9]. Ми дослідили вплив різних форм (вільної та іммобілізованої) доксорубіцину на формування везикул на поверхні трансформованих мишачих фібробластів лінії L929.

Результати проведеного дослідження свідчать про низьку токсичність олігомерного носія навіть у концентрації 30 мкг/мл після 24 год інкубації, оскільки не було виявлено жодних суттєвих цитоморфологічних змін у клітинах-мішенях (рис. 6, Б) порівняно з інтактними клітинами в контролі (рис. 6, А).

Водночас 24-годинна дія на клітини лінії L929 доксорубіцину (0,1 мкг/мл), іммобілізованого на носіїві ОеН, супроводжується активним утворенням мембранних везикул, характерних для апоптичних клітин (рис. 6, Б).

Окрім того, клітини-мішені за такої дії стають більш заокругленими і втрачають свої довгі відростки, що є характерними ознаками фібробластів. У клітинах, інкубо-

ваних у середовищі з вільним доксорубіцином у концентрації 0,1 мкг/мл, такі морфологічні зміни були виражені значно слабше і розміри мембранних везикул були істотно меншими (рис. 7, А).

Важливу роль у забезпеченні різних цитодеструктивних процесів, що відбуваються під час апоптозу, відіграють специфічні клітинні протеази — каспази. Мішенями дії каспаз можуть слугувати не лише регуляторні, але й структурні протеїни ядра і цитоскелета, зокрема ламіни, актин, Gas2 і α -фодрин (спектрин нееритроїдних клітин) [7, 10, 11]. Чутливими до дії каспаз є також такі протеїни, як NuMa (nuclear mitotic associated protein) і D4 (інгібітор дисоціації G-протеїну). Наслідком дії каспаз є дезінтеграція ядра й дезагрегація цитоскелета [7]. Велику роль в утворенні апоптичних тілець відіграють мікротрубочки, які забезпечують периферичне розміщення хроматину, створюючи своєрідні примембранні осередки фрагментованих ядер [12].

Оскільки результати наших досліджень, проведених *in vitro*, продемонстрували перспективність олігоелектроліту ВА-МАНГ-МП як носія протипухлинних препаратів було здійснено серію досліджень *in vivo* з використанням цього олігомера для достав-

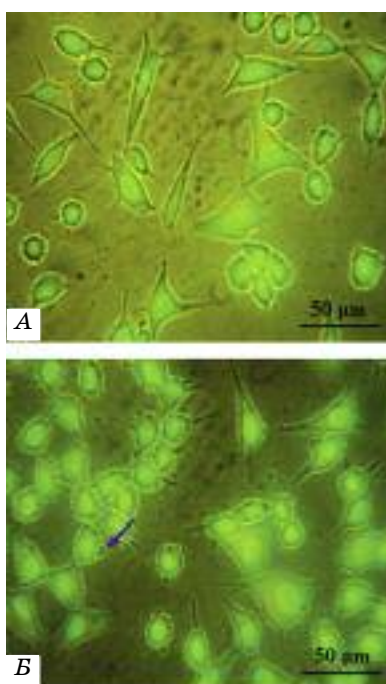


Рис. 6. Фібробласти миші лінії L929, вирощені на середовищі:

без додавання досліджуваного олігоелектролітного носія (А) і за присутності цього носія (Б, контроль) у концентрації 30 мкг/мл (24 год інкубації). Фарбування клітин флуоресцентним барвником акридиновим оранжевим

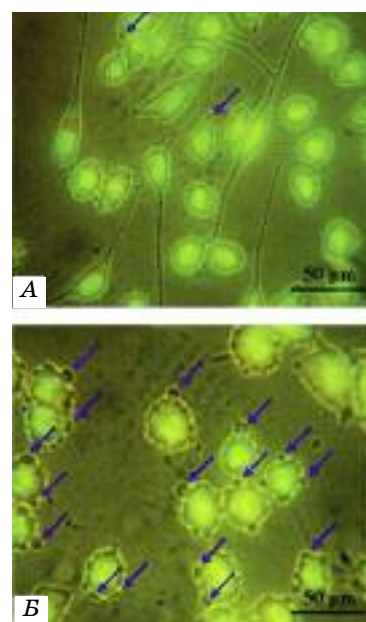


Рис. 7. Фібробласти миші лінії L929, вирощені на середовищі:

з чистим доксорубіцином (0,1 мкг/мл) (А) та на середовищі з олігоелектролітним носієм ОеН з іммобілізованим доксорубіцином (0,1 мкг/мл) після 24 год інкубації (Б). Фарбування клітин флуоресцентним барвником акридиновим оранжевим.

Синіми стрілками позначено утворення мембранних везикул

лення доксорубіцину в клітини мишей-пухлиноносіїв. Для цього мишам лінії BALB/C було прищеплено експериментальну пухлину — лімфому Немета-Келнера NK/Ly. Показано, що введення здоровим мишам розчину вільного носія ОеН у концентраціях 1, 10 і 100 мг на 1 кг маси тіла тварини протягом 8 днів не призводило до їх загибелі чи до будь-якого видимого порушення життєвих функцій тварин. Це свідчить про низьку токсичність олігомера не лише *in vitro*, але й *in vivo* щодо організму миші.

Для лікування мишей із прищепленою лімфомою NK/Ly тваринам вводили вільний доксорубіцин у концентраціях 0,1 та 1 мг/кг маси тіла тварини, а також доксорубіцин, іммобілізований на ОеН (розраховані концентрації доксорубіцину також становили 0,1 та 1 мг/кг маси тіла тварини). Ріст пухлинних клітин в асциті контролювали щоденним зважуванням тварин. За суттєвого (понад 5 г) збільшення маси тіла миші-пухлиноносія внаслідок зростання об'єму пухлинного асциту проводили дренаж асцитної рідини. На ранніх стадіях росту пухлини відбирали 1–2 мл асциту, тоді як на пізніх стадіях — 10–12 мл. Асцит використовували для подальшого дослідження пухлинних клітин. На рис. 8–10 подано типові характеристики зміни маси тіла мишей-пухлиноносіїв у контролі (без введення препаратів, за щоденного введення фізіологічного розчину) і за щоденного введення досліджуваних препаратів (доксорубіцин у вільному та іммобілізованому на носієві стані). Як видно з даних, наведених

на рис. 8, у разі введення мишам-пухлиноносіям фізіологічного розчину тварини гинуть через 25–30 днів після прищеплення їм лімфоми NK/Ly.

Лікування мишей з лімфомою NK/Ly доксорубіцином мало терапевтичний ефект, який залежав від дози цього протипухлинного препарату. Встановлено, що введення доксорубіцину в дозі 0,1 мг/кг маси тіла сприяло зростанню тривалості життя тварин до 40–45 днів, однак їхня маса тіла і далі збільшувалась, і миші гинули внаслідок хвороби (рис. 9, А). Водночас введення доксорубіцину у дозі 1 мг/кг маси тіла припинило ріст пухлини вже після перших ін'єкцій цього препарату.

Після такого введення препарату миші, яким було прищеплено лімфому NK/Ly, практично повністю виживалися (наростання асциту припинялося) і залишалися живими протягом щонайменше трьох місяців спостереження за ними. Разом з тим спостерігали наслідки токсичного впливу доксорубіцину на організм таких мишей, що виявлялись у вигляді певного зниження маси тіла наприкінці введення препарату порівняно з початковою масою тварин (рис. 9, Б).

Уведення мишам-пухлиноносіям доксорубіцину, іммобілізованого на олігомерному носієві у концентраціях 0,1 та 1 мг на 1 кг маси тіла тварин, мало ефект, подібний до досягнутого за введення доксорубіцину у концентрації 1 мг/кг маси тіла. Миші не набирали маси тіла (не наростав асцит) і залишалися живими протягом тривалого часу (більше 3 місяців) (рис. 10).

Ріст пухлини NK/Ly у миші

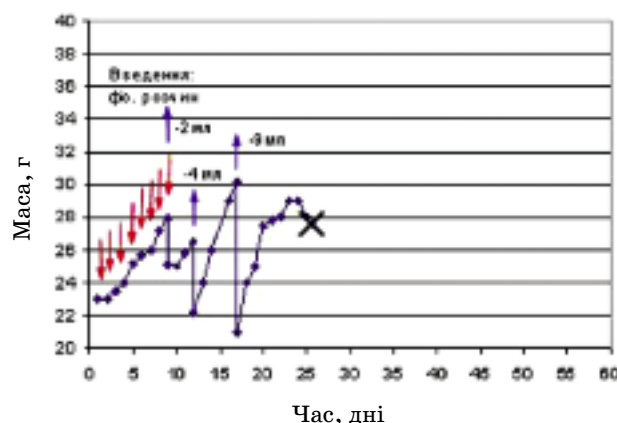


Рис. 8. Динаміка маси тіла мишей (типичний дослід) із прищепленою лімфомою NK/Ly (показник росту пухлини) в контролі (щоденне введення фізіологічного розчину, 0,5 мл):

червоними стрілками позначено час введення препарату, синіми — час дренажу. Хрестик означає загибель тварини.

Кількість досліджуваних мишей-пухлиноносіїв становила 10

Слід зазначити, що за такого введення препарату також не спостерігали зниження маси тіла наприкінці процедури внаслідок токсичної дії доксорубіцину.

Про вищу ефективність дії доксорубіцину, іммобілізованого на новому олігомерному носії порівняно з дією вільного доксорубіцину щодо лімфомних клітин NK/Ly свідчать також результати деструктивних змін у цих клітинах, які вивчали за допомогою флуоресцентних барвників.

Як видно з рис. 11, в асциті мишей-пухлиноносіїв після введення іммобілізованого

доксорубіцину є значно більше ушкоджених лімфомних клітин (червоне свічення внаслідок накопичення в клітинах пропідію йодиду). Отже, здійснене нами введення препарату мишам з лімфомою NK/Ly за допомогою іммобілізованого доксорубіцину спричинює більш ефективно відмирання пухлинних клітин, ніж за умов введення тваринам вільного доксорубіцину в такій самій дозі.

Таким чином, проведені дослідження показали, що застосування олігомерного нанорозмірного носія ВА-МАНГ-МП для

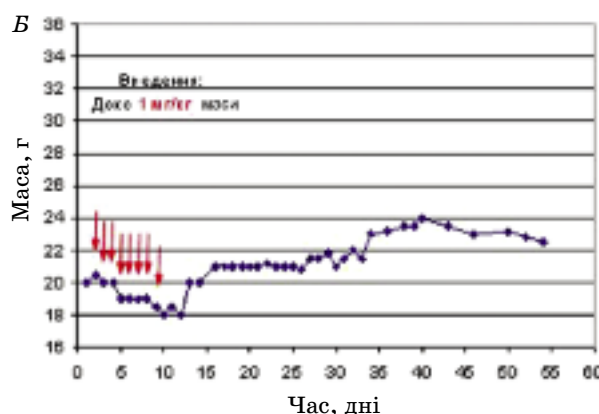
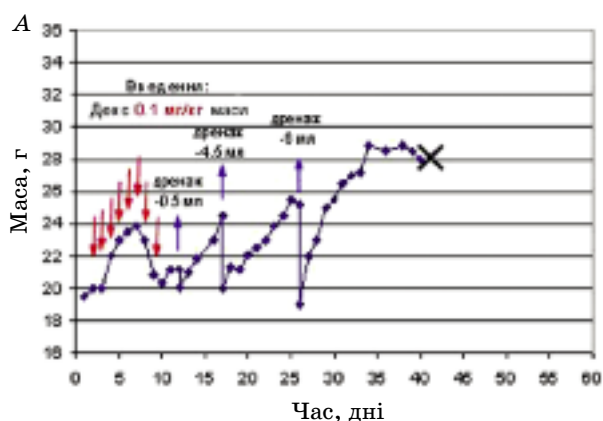


Рис. 9. Динаміка маси тіла мишей (типовий дослід) із прищепленою лімфомою NK/Ly (показник росту пухлини) в контролі за умов щоденного введення доксорубіцину: у концентрації 0,1 мг/кг маси тіла (А) та доксорубіцину в концентрації 1 мг/кг маси тіла (Б). Червоними стрілками позначено час введення препарату, синіми — час дренажу. Хрестик означає загибель тварини. Кількість досліджених мишей-пухлиноносіїв становила 10

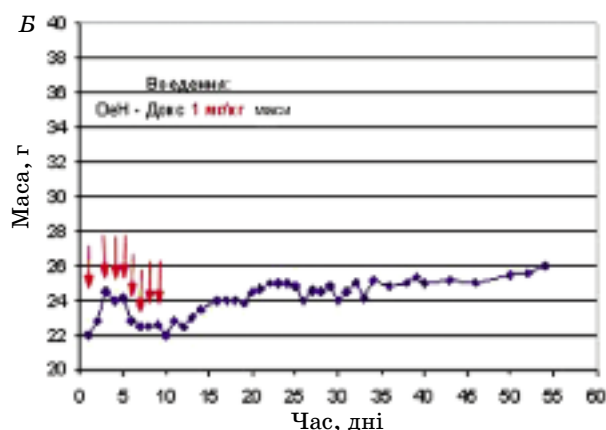
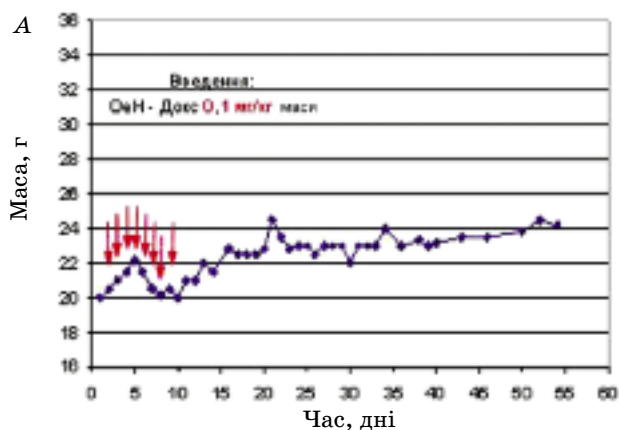


Рис. 10. Динаміка маси тіла мишей (типовий дослід) із прищепленою лімфомою NK/Ly (показник росту пухлини):

в контролі за умов щоденного введення доксорубіцину, іммобілізованого на ОеН у концентрації 0,1 мг/кг маси тіла (А) та доксорубіцину, іммобілізованого на олігомерному наноносії (ОеН-Докс) у концентрації 1 мг/кг маси тіла (Б). Червоними стрілками позначено час введення препарату, синіми — час дренажу.

Кількість досліджених мишей-пухлиноносіїв становила 10

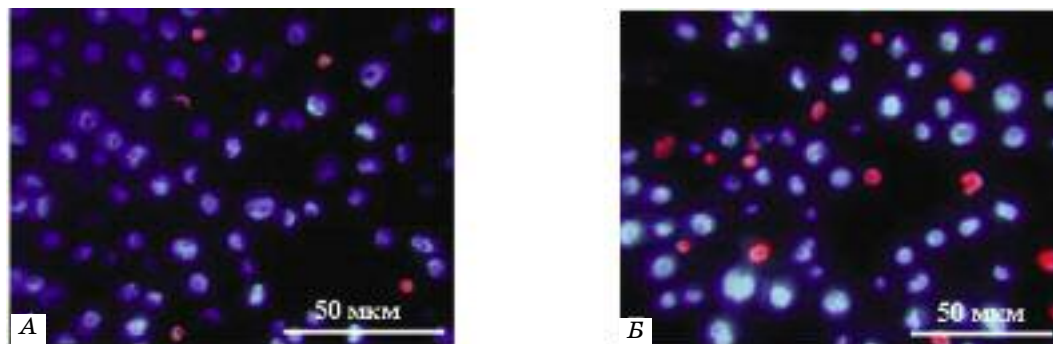


Рис 11. Клітини лімфоми мишей NK/Ly, одержані від тварин-пухлиноносіїв після хіміотерапії (5 ін'єкцій) із використанням:

вільного доксорубіцину (А, 0,1 мг/кг) і доксорубіцину (0,1 мг/кг), іммобілізованого на олігомерному нанорозмірному носіїві (Б).

Комбіноване фарбування ядер клітин флуоресцентним барвником Hoechst (синє свічення) і накопичення пропідію йодиду в ушкоджених клітинах (червоне свічення)

доставлення доксорубіцину в клітини пухлин дає змогу не лише *in vitro*, але й *in vivo* знизити лікувальну дозу цього препарату щонайменше у 10 разів зі збереженням протипухлинного ефекту. Ці результати є важливими для забезпечення зниження виявів негативних побічних ефектів, характерних як для доксорубіцину, так і для багатьох інших протипухлинних препаратів, які застосовують у хіміотерапії пухлин різної етіології.

Автори роботи вдячні за підтримку Західноукраїнського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC, 2010–2011 роки).

ЛІТЕРАТУРА

1. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M., Nanotechnological applications in medicine. // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — V. 18. — P. 26–30.
2. Clavinas H., Crajcsi P., Cserepes J., Sarcadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity // *Curr. Drug Deliv.* — 2004. — V. 1. — P. 27–42.
3. Jäger E., Jäger A., Chytil P. et al. Combination chemotherapy using core-shell nanoparticles through the self-assembly of HPMA-based copolymers and degradable polyester // *J. Contr. Rel.* — 2012. — V. 3659, N 12. — P. 00805-X.
4. Wang T., Deepa B., Fagbohun O. A. et al. Enhanced binding and killing of target tumor cells by drug-loaded liposomes modified with tumor-specific phage fusion coat protein // *Nanomedicine (Lond)* . — 2010. — V. 5, N 4. — P. 563–574.
5. Zhang F., Zhu L., Liu G. et al. Imaging of Tumor Response to Doxil // *Theranostics.* — 2011. — V. 1. — P. 302–309.
6. Euliss L. E., DuPont J. A., Gratton S., DeSimone J. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine // *Chem. Soc. Rev.* — 2006. — V. 35, N. 11. — P. 1095–2004.
7. Сопін Є. Ф., Виноградова П. П. Основи біохімічних методів дослідження. — К.: Вища школа. — 1975. — 244 с.
8. Lu Ch., Zhu F., Cho Y.-Y. et al. Cell Apoptosis: Requirement of H2AX in DNA Ladder Formation but not for the Activation of Caspase-3 // *Mol. Cell.* — 2006. — V. 23, N 1. — P. 121–132.
9. Singh N. D., Sharma A. K., P. et al. Patil Studies on Apoptotic Changes in Combined Toxicity of Citrinin and Endosulfan in Pregnant Wistar Rats and Their Fetuses // *Toxicol. Int.* — 2012. — V. 19, N. 2. — P. 138–143.
10. Savic R., Luo L. B., Eisenberg A., Maysinger D. Nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles // *Science.* 2003. — V. 300. — P. 615–618.
11. Landowski T., Gleason-Gurman M., Dalton W. // *Blood.* — 1997. — V. 6. — P. 1854–1861.
12. Kahizuka A., Miller W., Umesono K. et al. // *Cell.* — 1991. — V. 66. — P. 663–667.

**ДЕЙСТВИЕ ДОКСОРУБИЦИНА,
ДОСТАВЛЕННОГО В ОПУХОЛЕВЫЕ
КЛЕТКИ *in vitro* И *in vivo*
НОВЫМ НАНОРАЗМЕРНЫМ
ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫМ
ОЛИГОЭЛЕКТРОЛИТНЫМ НОСИТЕЛЕМ**

Н. Н. Бойко¹, Ю. В. Сенькив^{1,3},
Е. А. Шляхтина^{1,3}, О. Ю. Ключивская¹,
Н. Р. Скороход¹, Н. Е. Митина²,
Т. В. Скорохода², М. М. Москвин²,
А. С. Заиченко², Р. С. Стойка^{1,3}

¹Институт биологии клетки НАН Украины,
Львов, Украина

²Национальный университет «Львовская
политехника», Украина

³Львовский национальный университет
им. Ивана Франко, Украина

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Одной из главных задач современной биофармацевтики является разработка новых наноразмерных носителей с низкой токсичностью, заданным размером, регулируемым откликом на локальные и удаленные воздействия, возможностями визуализации действия лекарств и результатов диагностики. В работе использован новый олигомерный носитель ВА-МАНГ-МП для доставки противоопухолевого препарата доксорубицина в опухолевые клетки различных линий. Синтезированный олигомерный носитель был дополнительно функционализирован фосфатидилхолином. Показано, что такая доставка доксорубицина в клетки-мишени позволяет снизить его действующую цитотоксическую дозу в 10 раз по сравнению с дозой свободного доксорубицина при сохранении одинакового по уровню антинеопластического эффекта. Этот дозовый эффект был продемонстрирован как *in vitro* на различных опухолевых клетках млекопитающих, так и *in vivo* на мышцах с экспериментальной лимфомой НК/Лу. Действие иммобилизованного доксорубицина сопровождалось более интенсивным, чем при действии свободного доксорубицина, образованием везикул на поверхности клеток-мишеней *in vitro* и межнуклеосомной фрагментацией их ДНК, а также более высокой долей мертвых клеток в асцитной жидкости мышей с лимфомой НК/Лу после введения препарата. Таким образом, синтезированный наноразмерный носитель на основе олигоэлектролитов является перспективной системой для доставки противоопухолевых препаратов в клетки-мишени.

Ключевые слова: доставка доксорубицина, опухолевые клетки, олигоэлектролиты, наноразмерные частицы.

**ACTION OF DOXORUBICIN DELIVERED
TO TUMOR CELLS *in vitro* AND *in vivo*
BY NOVEL NANOSCALE
OLIGOELECTROLYTIC CARRIER**

N. M. Boiko¹, Yu. V. Senkiv^{1,3},
Ye. A. Shlyakhtina^{1,3}, O. V. Kluchivska¹,
N. P. Skorohid¹, N. E. Mitina²,
T. V. Skorohoda², M. M. Moskvina²,
O. S. Zaichenko², R. S. Stoika^{1,3}

¹Institute of Cell Biology of National Academy
of Sciences of Ukraine, Lviv

²National University «Lviv Polytechnics»,
Ukraine

³Lviv National Ivan Franko University, Faculty
of Biology, Ukraine

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

The main tasks of modern biopharmaceutics are focused at the development of new nanoscale carriers with low toxicity, given size, regulated response to local and remote effects, and capability of visualization of drug action and diagnostic results. A novel oligomeric carrier VAMANG-MP for delivery of the anticancer drug doxorubicin to tumor cells of different lines have been used. The synthesized oligomeric carrier was additionally functionalized by phosphatidylcholine. It was demonstrated that such delivery of doxorubicin to the target cells permits 10 times decreasing of its acting cytotoxic dose comparing with such dose of free doxorubicin, with preserving similar level of the antineoplastic effect. This dose-specific effect was demonstrated both *in vitro* towards various mammalian tumor cells, and *in vivo* towards mice with experimental NK/Ly lymphoma was shown. Action of immobilized doxorubicin was followed by more intense formation of vesicles on a surface of the target cells *in vitro*, and by their inter-nucleosomal DNA fragmentation as compared to action of free doxorubicin, as well as by appearance of higher amount of dead cells in ascitic fluid of the treated NK/Ly lymphoma mice. Thus, the synthesized nanoscale oligoelectrolytic carrier is a perspective system for delivery of anticancer drugs to target cells.

Key words: doxorubicin delivery, tumor cells, oligoelectrolytes, nanoscale particles.