



УДК: 54.057+547.311+57.085.23+576.5+616.006

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ДОКСОРУБІЦИНУ НА ОЛІГОЕЛЕКТРОЛІТНОМУ ПОЛІМЕРНОМУ НОСІЇ ВЕП-ГМА-ПЕГ ПІДВИЩУЄ ШВИДКІСТЬ НАДХОДЖЕННЯ ЦЬОГО ПРОТИПУХЛИННОГО ПРЕПАРАТУ В РАКОВІ КЛІТИНИ ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЙОГО ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ

**Ю. В. Сеньків^{1,2,4}, А. Р. Рябцева³, П. Хеффетер⁴, Н. М. Бойко¹,
Є. А. Шляхтіна¹, Н. Є. Мітіна³, В. Бергер⁴, О. С. Заїченко³, Р. С. Стойка¹**

¹Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

³Національний університет „Львівська Політехніка”, пл. Св. Юра, 2, Львів 79013, Україна

⁴Інститут ракових досліджень, Медичний університет Відня
вул. Боршкегассе, 8а, Відень 1090, Австрія
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Застосування спеціальних носіїв для доставки лікарських препаратів у клітини-мішені може допомогти подолати цілу низку проблем, що виникають при лікуванні тяжких захворювань, у першу чергу ракових. Це – негативні наслідки неспецифічного впливу ліків на здорові клітини організму, низька чутливість ракових клітин до деяких протипухлинних препаратів, використаних у нетоксичній для організму дозі, резистентність клітин злоякісних пухлин до хіміотерапевтичних чинників і резистентність патогенних мікроорганізмів до антибіотиків. У даній роботі було досліджено ефективність застосування нової нанорозмірної системи доставки ліків у клітини пухлин, як чутливих, так і резистентних до дії протипухлинних препаратів, зокрема доксорубіцину. Для цього використовували модифікований поліетиленгліколем полімерний носій ВЕП-ГМА, синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету „Львівська Політехніка”. Показано, що доксорубіцин, іммобілізований на такому носії, значно сильніше, ніж вільний доксорубіцин, пригнічує проліферацію клітин лінії А549 карциноми легені людини, лінії НСТ116 колоректальної карциноми людини, лінії MCF-7 та її резистентної до доксорубіцину сублінії MCF-7/ADR карциноми молочної залози людини. Необхідно підкреслити, що застосування полімерного носія ВЕП-ГМА-ПЕГ дало змогу знизити діючу дозу доксорубіцину щонайменше у 10 разів зі збереженням антинеопластичного ефекту цього препарату, що передбачає суттєве зменшення негативних побічних ефектів такої хіміотерапії. Встановлено пришвидшене поглинання пухлинними клітинами доксорубіцину у складі транспортного комплексу з носієм, порівняно з поглинанням його вільної форми. Показано, що макропіноцитоз чи ендоцитоз не задіяні у поглинанні клітинами таких комплексів доксорубіцину з полімерним носієм. Проводяться

роботи з подальшого вдосконалення створеного нанорозмірного полімерного носія шляхом його додаткової функціоналізації з метою підвищення адресності його дії на пухлинні клітини *in vitro* та *in vivo*.

Ключові слова: нанорозмірні полімерні носії ліків, доксорубіцин, клітини пухлин людини, резистентність клітин до ліків.

ВСТУП

Раннє діагностування і лікування ракових захворювань, особливо їхніх форм із резистентністю до протипухлинних препаратів, є найбільш актуальними проблемами сучасної медицини. Через пізнє діагностування, неадекватну стратегію боротьби з агресивними метастазами і численні негативні побічні ефекти, характерні для дії протипухлинних препаратів, прогрес у подоланні онкологічних захворювань залишається незначним. Це при тому, що досягнуто значних успіхів у вивченні біології пухлинних клітин, профілактиці раку і в розвитку методів молекулярної генетики для потреб онкології [5].

Підраховано, що упродовж одного року хіміотерапевтичного лікування хворих на рак від третини до половини пухлин набувають резистентності до первинної цитотоксичної дії різних протиракових препаратів. Цей феномен значною мірою зумовлений розвитком у пухлинних клітин множинної резистентності до ліків. Протягом останнього десятиліття було створено нові ефективні засоби адресної доставки ліків, що базуються на використанні специфічних наночастинок для транспортування ліків до місця запалення чи патологічного процесу, а також для контролювання курсу лікування на клітинному рівні. Створені також носії ліків, що дають можливість візуалізувати процес діагностування і ходу лікування [8, 15].

Розробка нових нанорозмірних систем для доставки лікарських засобів у клітини пухлин є одним із найбільш пріоритетних завдань сучасної фармацевтичної промисловості. Такі носії протипухлинних препаратів повинні мати унікальні структурно-функціональні властивості, зокрема малий розмір частинок, їх високу стабільність, низьку токсичність і біодеградабельність, а також специфічний гідрофільно-гідрофобний баланс. Поліфункціональні наночастинок на основі полімерних матеріалів є оптимальними системами доставки ліків, які завдяки цим системам можуть також долати природні біологічні бар'єри як на тканинному, так і на клітинному рівнях [2, 7].

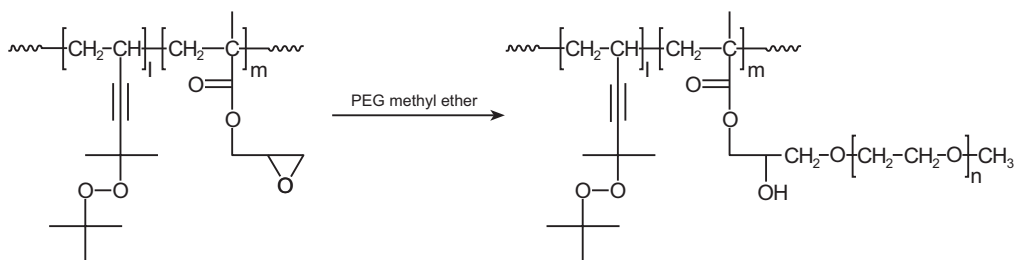
У нашому дослідженні для доставки протипухлинного препарату доксорубіцину до клітин-мішеней використано нові біофункціоналізовані олігоелектролітні полімерні матеріали із керованою структурою, а також функціональною і реакційною здатністю. Вони були синтезовані у Національному університеті „Львівська Політехніка” і містили у своєму складі поліетиленгліколь, що давало змогу комплексу з протипухлинним препаратом легко проникати крізь подвійний ліпідний шар клітинної мембрани. Встановлено, що така інкапсуляція доксорубіцину в нанорозмірну полімерну міцелу не лише суттєво пришвидшує проникнення цього протипухлинного препарату в ракові клітини, але й інтенсифікує його токсичну дію щодо цих клітин. При цьому важливо зазначити, що такі ефекти спостерігаються не лише в чутливих до доксорубіцину ракових клітинах людини, але й у їхніх похідних, які мають резистентність до протипухлинних препаратів, включно з доксорубіцином.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Клітини та їх культивування. У дослідях використовували клітини лінії A549 аденокарциноми легені людини (отримані з колекції клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ), а також клітини лінії MCF-7 раку молочної залози людини (батьківський тип клітин і їхня сублінія MCF-7/ADR, резистентна до доксорубіцину) та клітини лінії HCT116 (колоректальна карцинома людини), які були надані для роботи проф. Бертом Фогельштайном (Університет Джона Хопкінса, Балтімор, США). Клітини культивували в середовищі Ігла у модифікації Дульбекко (DMEM, Sigma) із додаванням 10% сироватки крові коров'ячих ембріонів (Sigma). Клітини вирощували в CO₂-інкубаторі при температурі 37°C, 5%-й концентрації CO₂ і 100%-й відносній вологості. Пересів клітин здійснювали через 2–3 дні у співвідношенні 1:5 [20].

Олігомерні носії ВЕП-ГМА-ПЕГ, використані у роботі, були розроблені та синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного університету „Львівська Політехніка” у групі під керівництвом к.х.н. О. С. Заїченка [6, 19].

Схематична формула олігомерного носія:



Визначення цитотоксичної дії доксорубіцину (Sigma, Австрія) і його інкапсульованої на полімерному носії комплексу здійснювали на пухлинних клітинах, які висівали у 96-лункові пластикові планшети (Costar) у середовищі DMEM за присутності 10% сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Через 24 год додавали доксорубіцин або його комплекс у різних концентраціях. Підрахунок кількості клітин здійснювали через певні проміжки часу в гемоцитометричній камері. Густину клітинної суспензії визначали за формулою: $s = 12500n$, де s – кількість клітин в 1 мл суспензії, n – середня кількість клітин у 5-х великих квадратах гемоцитометричної камери. Ефективність цитотоксичної дії досліджуваних речовин визначали за динамікою кількості клітин щодо їхньої початкової кількості. Барвник трипановий синій використовували для підрахунку клітин, а також у кінцевій концентрації 0,01% для фарбування мертвих клітин у суспензії.

Конфокальну мікроскопію проводили на мікроскопі LSM410; Zeiss, (Jena, Німеччина). Для виявлення цитоскелету у роботі використовували Phalloidin, мічений флуоресцентним барвником FITC (довжина хвилі збудження 450–480 нм та емісії 510–540 нм). Для фарбування ядерного хроматину використовували флуоресцентний барвник DAPI (довжина хвилі збудження 450–480 нм та емісії 510–540 нм). Доксорубіцин у клітинах-мішенях вдається виявити за його власною червоною флуоресценцією (довжина хвилі збудження 485 нм та емісії 520 нм). Фотографування клітин здійснювали цифровою камерою Canon Power Shot A630.

Проточну цитофлуориметрію здійснювали на приладі Becton Dickinson (Palo Alto, США) для визначення інтенсивності поглинання клітинами доксорубіцину та його інкапсульованої у носій форми. Для цього пухлинні клітини лінії MCF-7, MCF-7/ADR та A549 висівали у 6-лункові пластикові планшети (5×10^5 клітин на 1 мл середовища DMEM із додаванням 10% сироватки крові ембріонів корови) і залишали в CO_2 -інкубаторі при 37°C . Через 24 год до клітин додавали вільний доксорубіцин (Dox) або доксорубіцин, іммобілізований на полімерному носії ВЕП-ГМА-ПЕГ (PC-Dox) у концентраціях 100, 250, 500 і 1000 нМ. Після 3-годинної інкубації клітини відділяли від поверхні лунки планшета трипсинізацією (10% розчин трипсину) і двічі промивали забуференим фізіологічним розчином (pH 7,4), після чого визначали інтенсивність флуоресценції за допомогою проточного цитофлуориметра.

Для дослідження екзоцитозу та макропіноцитозу клітини лінії MCF-7 висівали в 96-лунковий планшет (5×10^4 клітин/мл) в об'ємі 100 мкл на одну лунку в середовищі DMEM із додаванням 10% сироватки крові ембріонів корови і залишали в інкубаторі з 5% CO_2 при 37°C . Через 24 год видалляли культуральне середовище і клітини промивали двічі буфером EBSS (5,3 мМ KCl, 26,2 мМ NaHCO_3 , 117,2 мМ NaCl, 1,01 мМ NaH_2PO_4 , 5,56 мМ D-глюкози), а потім 1 раз забуференим фізіологічним розчином. Опісля до клітин додавали буфер EBSS (контроль) або 50 мкМ (кінцева концентрація) колхіцину (інгібітор макропіноцитозу) або 50 мкМ (кінцева концентрація) цитохалазину Б (інгібітор ендоцитозу). Клітини залишали на 1 год в інкубаторі з 5% CO_2 при 37°C , після чого їх промивали двічі буфером EBSS та 1 раз забуференим фізрозчином. Тоді до клітин додавали за відсутності світла вільний доксорубіцин або доксорубіцин, іммобілізований на носії, у концентрації 1000, 1500 та 2000 нМ. Клітини поміщали на 1 год в CO_2 -інкубатор, відмивали від інкубаційного середовища, після чого в них визначали інтенсивність флуоресценції доксорубіцину (довжину хвилі збудження та емісії див. вище) на мікрофотометрі (Infinite® 200 PRO, von TECAN, Швейцарія).

Статистична обробка результатів. Усі досліди повторювали тричі з трьома паралелями у 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 значенням середньої похибки „m” [10]. На рисунках вона представлена біля кожної точки вертикальною лінією, довжина якої відповідає значенню „s”. Порівняння двох мінливих величин здійснювали на основі показника вірогідності різниці „t” (критерій Стьюдента). Відмінність між значеннями вважали достовірною, коли ймовірність різниці „p” була меншою за 0,05. Усі наведені обрахунки виконували за допомогою комп'ютерної програми GraphPad Prism 5.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Полімерний носій ВЕП-ГМА-ПЕГ був синтезований на основі олігомерних сполук, позначених як AP. На цих носіях було іммобілізовано протипухлинний препарат доксорубіцин, який широко використовують у клініці для хіміотерапії пацієнтів із раковими захворюваннями. До полімерного ланцюга носія було також приєднано поліетиленгліколь (ПЕГ). У тексті статті такі комплекси позначені PC-Dox (polymeric carrier-doxorubicin). Для порівняння антинеопластичної дії доксорубіцину

у вільній та іммобілізованій формі використовували різні лінії пухлинних клітин людини: НСТ116 (колоректальна карцинома людини), А549 (карцинома легені людини) і MCF-7 – (карцинома молочної залози людини) та її сублінія MCF-7/ADR, резистентна до дії доксорубіцину. Для дослідження антинеопластичної дії доксорубіцину, іммобілізованого на олігомерних носіях, використовували співвідношення носія до протипухлинного препарату, що дорівнювало 30:1. Для порівняння дії вільного та інкапсульованого на носії доксорубіцину розраховували вміст доксорубіцину в його комплексі з носієм.

У табл. 1 наведено дані щодо ефективності вільного та інкапсульованого доксорубіцину через 72 год їхньої дії на пухлинні клітини. Як видно, ефективність цитотоксичної дії, яку визначали за показником IC_{50} , суттєво зростає (від 4,33 до 11,8 рази залежно від лінії пухлинних клітин людини) за умов використання доксорубіцину, інкапсульованого в полімерному носії, порівняно з використанням вільного доксорубіцину. Важливо зазначити, що таке зростання було значно вищим, коли використовували пухлинні клітини, резистентні до дії доксорубіцину (зниження показника IC_{50} становить 4,33 для батьківської лінії MCF-7, чутливої до доксорубіцину, тоді як для сублінії MCF-7/ADR, резистентної до цього протипухлинного препарату, зниження цього показника дорівнює 8,02).

Таблиця 1. Інгібування проліферації ракових клітин вільним доксорубіцином і його комплексом із полімерним носієм ВЕП-ГМА-ПЕГ (IC_{50} – концентрація препарату, при якій досягається напівмаксимальне інгібування росту клітин)

Table 1. Inhibition of proliferation of tumor cells by free doxorubicin and its complex with the polymeric carrier VEP-GMA-PEG (IC_{50} – concentration of preparation at which half-maximal inhibition of cell growth is achieved)

Клітинна лінія	Доксорубіцин		Доксорубіцин з ВЕП-ГМА-ПЕГ		Кратність зростання інгібування
	IC_{50} , М	$\pm m$, нМ	IC_{50} , М	$\pm m$, нМ	
A549	1138,12	11,21	96,45	0,14	11,80
MCF-7	148,04	2,82	34,21	2,65	4,33
MCF-7/ADR	547,10	3,27	68,16	3,12	8,02
НСТ116	112,98	0,46	11,83	0,87	9,55

Отже, використання синтезованого полімерного носія для доставки доксорубіцину в клітини-мішені дає змогу не лише ефективніше діяти на чутливі до доксорубіцину клітини, але й ефективніше долати резистентність пухлинних субліній до цього протипухлинного препарату. Звідси також впливає можливість суттєвого зниження терапевтичної дози цього високотоксичного препарату (приблизно в 10 разів), що дасть змогу суттєво зменшити негативні побічні ефекти використання доксорубіцину в хіміотерапії злоякісних пухлин.

У науковій літературі описані й інші полімерні носії для доксорубіцину, використання яких давало змогу долати значною мірою резистентність пухлинних клітин до цього лікувального препарату [9, 11, 18]. Застосований у нашій роботі полімерний носій не лише є малотоксичним [1, 13], але й допомагає легко здійснювати його біо-функціоналізацію з метою покращення біосумісності, а також адресності дії в організмі.

Дослідження часової динаміки дії вільного й інкапсульованого доксорубіцину на пухлинні клітини людини дало змогу виявити сильний цитотоксичний ефект інкапсульованої форми препарату вже на 1-, 3-, і 6-й годині його дії на клітини лінії

A549 із досягненням IC_{50} вже через 24 год. У той же час за дії вільного доксорубіцину на клітини цієї лінії IC_{50} не досягалася навіть через 72 год. Доцільно зазначити, що клітини лінії A549 карциноми легені людини характеризуються значною стійкістю до дії різних протипухлинних чинників завдяки своїй високій проліферативній активності та, головним чином, завдяки надекспресії білків MRP1, MRP2, BCRP, LRP, відповідальних за резистентність пухлинних клітин до лікарських препаратів [10].

Наступним етапом у нашій роботі було дослідити, чи корелює зростання ступеня цитотоксичності доксорубіцину після його іммобілізації на полімерному носії з підвищеною швидкістю доставки доксорубіцину в клітини-мішені. Для цього використовували два методи визначення власної люмінесценції доксорубіцину після його поглинання клітинами: проточну цитофлуориметрію (рис. 2) і конфокальну флуоресцентну мікроскопію (рис. 3). Люмінесценція доксорубіцину (екстинція / емісія – 485 нм / 520 нм). В обох випадках надходження доксорубіцину в клітини-мішені визначали після їхньої інкубації з вільним чи іммобілізованим на носії.

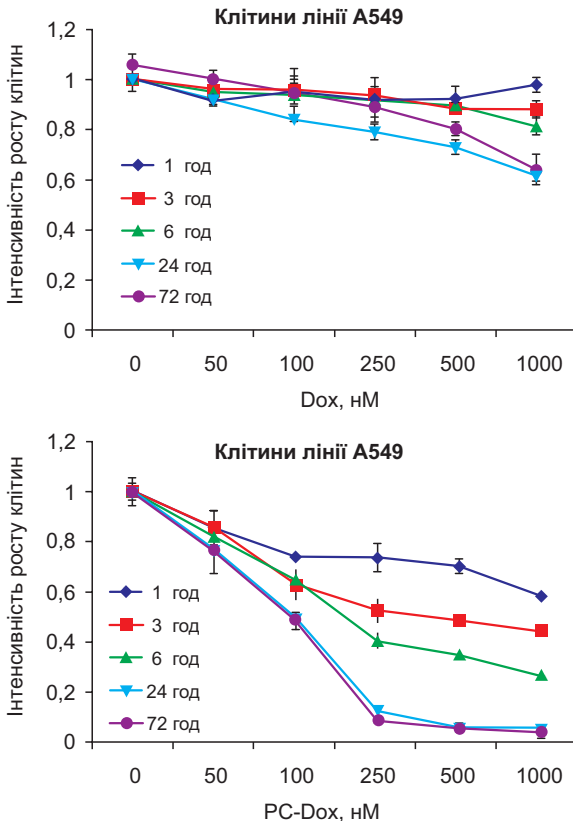


Рис. 1. Динаміка росту клітин A549 за присутності в культуральному середовищі доксорубіцину, іммобілізованого на носії ВЕП-ГМА-ПЕГ (PC-Dox), і вільного доксорубіцину (Dox) через 1, 3, 6, 24 і 72 години їхньої дії (показник щодо початкової кількості клітин)

Fig. 1. The growth of A549 cells in the presence in culture medium doxorubicin immobilized on the carrier VEP-GMA-PEG (PC-Dox) and free doxorubicin (Dox) after 1, 3, 6, 24 and 72 hours of their actions (index relative to the initial cell number)

Встановлено, що доксорубіцин у комплексі з носієм нагромаджується у клітинах раку молочної залози уже за концентрації 200 нМ, тоді як доксорубіцин у вільній формі за такої концентрації лише починає нагромаджуватися у клітинах і, як наслідок, інтенсивність його люмінесценції є незначною. Важливо підкреслити, що доксорубіцин, іммобілізований на полімерному носії, сильніше нагромаджується також у резистентних до ліків лінійках пухлинних клітин, таких як A549 та MCF-7/ADR.

Оскільки доксорубіцин у вільному стані майже не нагромаджувався пухлинними клітинами ліній A549 та MCF-7/ADR, на відміну від його суттєвого нагромадження в цих клітинах за дії на них комплексів доксорубіцину з полімерним носієм, можна вважати, що такий носій допомагає цьому препаратіві долати наявну в даних клітинах систему, що забезпечує множинну резистентність до ліків. Відомо, що екскреція ксенобіотиків, включно з ліками, із клітин часто пов'язана із функціонуванням транспортних білків плазматичної мембрани, до яких належить Р-глікопротеїн (P-gp), транспортні білки родини MRP та інші [12, 14, 17]. Функціонування Р-gp забезпечує резистентність клітин до багатьох протипухлинних препаратів (Multi-Drug Resistance – MDR), серед яких є антрациклінові антибіотики, алкалоїди рослинного походження, деякі флуоресцентні барвники, етидію бромід, граміцидин D та інші. Р-глікопротеїн належить до родини транспортерів ABC (ATP Binding Cassette). Їхня здатність транспортувати сполуки різної хімічної природи і механізми такої дії суттєво відрізняються від функціонування більшості лігандозв'язувальних білків [17]. Високий рівень експресії гена MDR виявлено в карциномах товстої кишки, нирки, гепатомах, раку наднирників, гострому мієлолейкозі, хронічному лімфолейкозі [12, 14].

Існує припущення, що функціонування транспортерів ABC може блокуватися зростанням позаклітинної концентрації хімічного чинника, або таким збільшенням швидкості проникнення чинника, при якому транспортери плазматичної мембрани не здатні перешкодити його масовому надходженню у клітину. Внаслідок цього концентрація цитостатика в цитоплазмі клітини може досягти настільки високого рівня, що з ним не будуть у змозі впоратися транспортери ABC ядра і тому цитостатик проникне з цитоплазми в ядро [4].

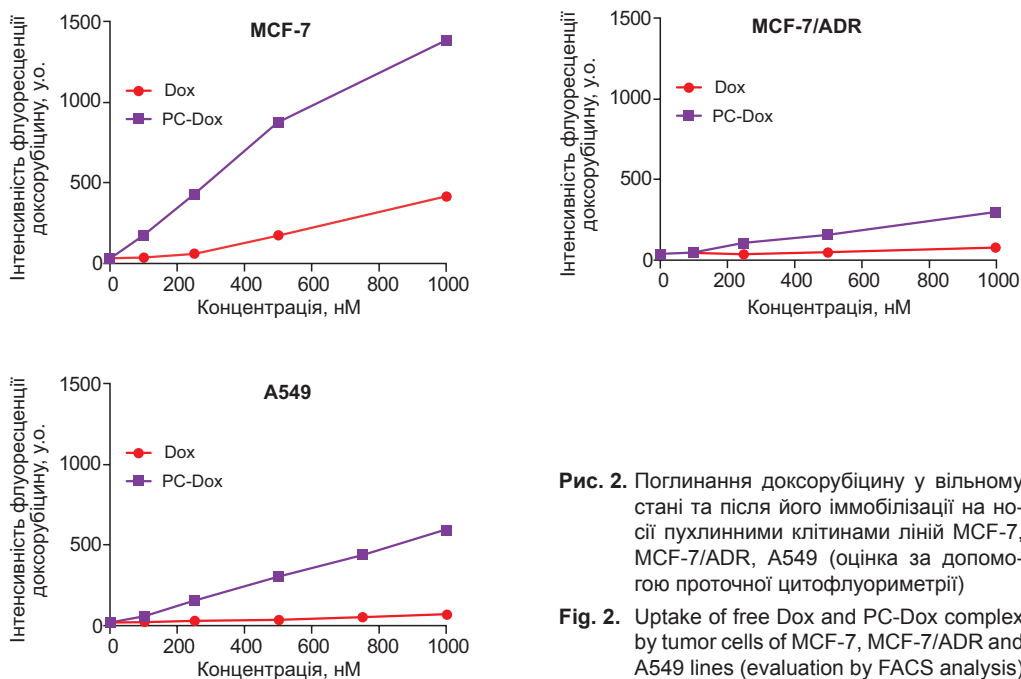


Рис. 2. Поглинання доксорубіцину у вільному стані та після його іммобілізації на носії пухлинними клітинами ліній MCF-7, MCF-7/ADR, A549 (оцінка за допомогою проточної цитофлуориметрії)

Fig. 2. Uptake of free Dox and PC-Dox complex by tumor cells of MCF-7, MCF-7/ADR and A549 lines (evaluation by FACS analysis)

Ми простежили за проникненням доксорубіцину в клітини лінії MCF-7 раку молочної залози людини в часі за дії на них вільного доксорубіцину та його комплексу із полімерним носієм (в обох випадках концентрація доксорубіцину була 2 мкМ. За результатами досліджу на конфокальному мікроскопі було сфотографовано клітини через 10 хв, 30 хв і 1 год їхньої інкубації із вказаними препаратами.

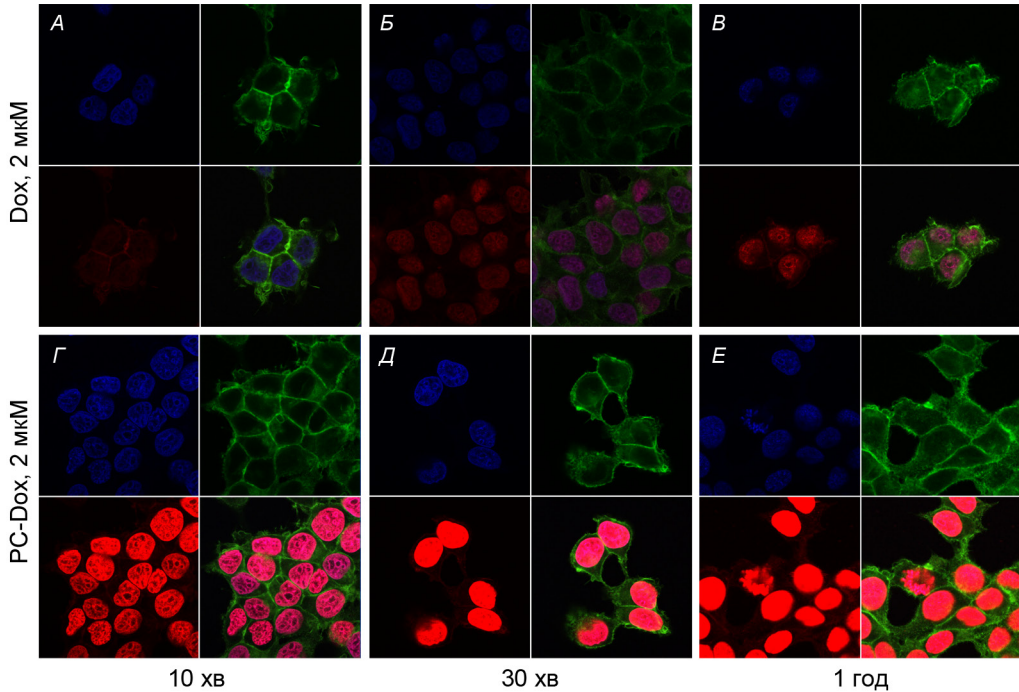


Рис. 3. Поглинання вільного доксорубіцину та його комплексу з полімерним носієм (концентрація протиракового препарату в обох випадках становила 2 мкМ) пухлинними клітинами лінії MCF-7 (оцінка за допомогою конфокальної мікроскопії). Фарбування клітин здійснювали фаллоїдином, міченим FITC (зелене світіння), флуоресцентним барвником DAPI (синє світіння) та доксорубіцином (червоне світіння)

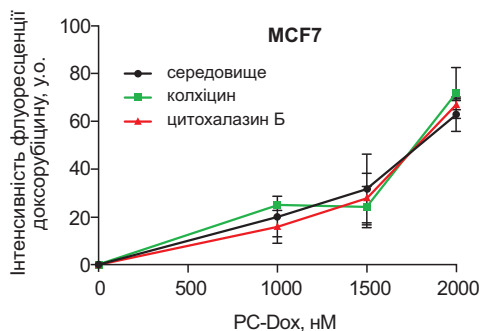
Fig. 3. Uptake of Dox and PC-Dox complex (2 μ M) in human breast cancer MCF-7 cells (confocal microscopy). Cell staining was performed by FITC-labeled Phalloidin (green color), fluorescent dye DAPI (blue color), and doxorubicin (red color)

Як видно з рис. 3, уже після 10-хвилинної інкубації клітин із доксорубіцином, іммобілізованим на полімерному носії, майже весь препарат виявляється в ядрі клітин, на відміну від вільного доксорубіцину, який лише через 1 год починає накопичуватися в ядерній мембрані.

Тому постало питання, яким може бути механізм, що забезпечує значно більш ефективне проникнення в клітини доксорубіцину в комплексі з носієм, порівняно з проникненням у клітини вільного доксорубіцину. Для цього ми використали колхіцин як інгібітор макропіноцитозу [3] та цитохалазин Б як інгібітор ендоцитозу [16]. Клітини інкубували протягом 1 год з одним із цих інгібіторів і після відмивання додавали до них комплекс доксорубіцину з полімерним носієм. Після 30-хвилинної інкубації пухлинних клітин лінії MCF-7 із цим комплексом клітини відмивали та визначали в них вміст доксорубіцину на флуоресцентному мікрофотометрі.

Рис. 4. Вплив колхіцину і цитохалазину Б на поглинання комплексу доксорубіцину з полімерним носієм людськими пухлинними клітинами лінії MCF-7

Fig. 4. Effect of colchicine and cytochalasin B on the uptake of PC-Dox complex by human tumor cells of MCF-7 line



Результати даного експерименту показали, що ні колхіцин, ні цитохалазин Б не впливають на інтенсивність поглинання комплексу доксорубіцину із полімерним носієм пухлинними клітинами лінії MCF-7. Звідси можна припустити, що полімерний компонент даного комплексу, що містить у своїй структурі поліетиленгліколь, допомагає доксорубіцину ефективно долати таку біологічну перешкоду, як плазматична мембрана клітини. Очевидно, така інкапсуляція робить доксорубіцин недоступним для мембранних транспортерів ABC, які забезпечують клітинам резистентність до різних ксенобіотиків, у т.ч. протипухлинних препаратів.

Як висновок, одержані в роботі результати свідчать про те, що доставка доксорубіцину в пухлинні клітини-мішені за допомогою синтезованих нанорозмірних полімерів класу AP із вбудованим у їхню структуру поліетиленгліколем, дає змогу суттєво (у 10 разів) знизити ефективну діючу концентрацію цього протипухлинного препарату зі збереженням його цитотоксичного ефекту. Отже, завдяки застосуванню таких носіїв можна значно знизити дозу протипухлинних препаратів, які характеризуються сильною побічною токсичністю для і без того ослабленого організму пацієнта, що піддається хіміотерапії.

ПОДЯКИ

Автори роботи вдячні за її фінансову підтримку з боку Західно-Українського Біомедичного Центру (WUBMRC, 2010–2011 роки) і Австрійського Бюро з обміну студентами та науковцями (OeAD, Австрійська Республіка).

1. *Bharali D.J., Khalil M., Gurbuz M.* et al. Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. **Int. J. Nanomedicine**, 2009; 4: 1–7.
2. *Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M.* Nanotechnological applications in medicine. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 2007; 18: 26–30.
3. *Cerquaglia C., Diaco M., Nucera G.* et al. Pharmacological and Clinical Basis of Treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with Colchicine or Analogues: An Update. **Current Drug Targets: Inflammation and Allergy**, 2005; 4(1): 117–124.
4. *Clavinas H., Crajcsi P., Cserepes J., Sarcadi B.* The role of ABC transporters in drug resistances, metabolism and toxicity. **Current Drug Delivery**, 2004; 1: 27–42.
5. *Dutta R.C.* Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. **Curr. Pharm. Des.**, 2007; 13(7): 761–769.
6. *Enari M., Sakahira H., Yokoyama H.* et al. Caspase-activated DNase that degrades DNA. **Nature**, 1998; 391: 43–46.
7. *Euliss L.E., DuPont J.A., Gratton S., DeSimone J.* Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, 2006; 35: 1095–104.

8. Geng F., Shen Y., Peng B. et al. Visualization and characterization of drug carrier transportation and distribution *in vivo*. Conf. Proc. IEEE **Eng. Med. Biol. Soc.**, 2005; 1: 508–11.
9. Han S., Liu Y., Nie X. et al. Efficient delivery of antitumor drug to the nuclei of tumor cells by amphiphilic biodegradable poly(L-aspartic acid-co-lactic acid)/DPPE co-polymer nanoparticles. **Small**, 2012; 8(10): 1596–606.
10. Hoffman B., Lieberman P. Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, protooncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. **Oncogene**, 1994; 9: 1807–11.
11. Horák D., Shagotova T., Mitina N. et al. Surface-Initiated Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate from Heterotelechelic Oligoperoxide-Coated γ -Fe₂O₃ Nanoparticles and their Engulfment by Mammalian Cells. **Chem. Mater**, 2011; 23(10): 2637–49.
12. Ishikawa T., Kuo M.T., Furuta K., Suzuki M. The human multidrug resistance-associated protein (MRP) gene family: from biological function to drug molecular design. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 2000; 38: 893–7.
13. Mozafari M.R., Pardakhty A., Azarmi S. et al. Role of nanocarrier systems in cancer nano-therapy. **Journ. of Liposome Research**, 2009; 19(4): 310–21.
14. Magnarin M., Morelli M., Rosat A. et al. Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK1 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 2004; 483: 19–28.
15. Manabe N., Hoshino A., Liang Y.Q. et al. Quantum dot as a drug tracer *in vivo*. **IEEE Trans. Nanobioscience**, 2006; 5(4): 263–7.
16. Theodoropoulos P.A., Gravanis A., Tsapara A. et al. Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed and capping. **Biochem. Pharmacol.**, 2009; 47(10): 1875–81.
17. Vollrath V., Wielandt A.M., Iruretagoyena M., Chianale J. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. **Biochem. J.**, 2006; 395: 599–609.
18. Zaichenko A., Mitina N., Shevchuk O. et al. Oligoperoxide Based Physically Detectable Nanocomposites for Cell Targeting, Visualization and Treatment. **AIP Conference Proceedings**, 2010; 1275: 178–82.
19. Рябцева А., Мітіна Н., Бойко Н. та ін. Синтез нових поліетиленглікольовмісних носіїв для доставки лікарських засобів. **Праці наукового товариства ім. Шевченка. Хемія і Біохемія**, 2011; 28: 19–27.

IMMOBILIZATION OF DOXORUBICIN ON THE OLYGOELECTROLYTIC POLYMERIC CARRIER VEP-GMA-PEG INCREASES ITS AND ANTICANCER ACTIVITY CELLULAR UPTAKE

Yu. V. Senkiv^{1,2,4}, A. R. Ryabtseva³, P. Heffeter⁴, N. M. Boiko¹,
E. A. Shlyakhtina¹, N. E. Mitina³, W. Berger⁴, O. S. Zaichenko³, R. S. Stoika¹

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

²Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine

³National University „Lviv Polytechnic”, 2, St. George Sq., Lviv 79013, Ukraine

⁴Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, 8a, Borshkegasse, Vienna 1090, Austria

e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Application of special systems for drug delivery into target cells might be useful for overcoming several problems in treatment of dangerous diseases. These are: consequences of nonspecific negative effects of drugs towards healthy cells, low sensitivity of cancer cells to anticancer drugs used in doses that are non-toxic for the organism,

resistance of tumor cells to anticancer drugs and of the pathogenic microorganisms to the antibiotics. Here we studied the efficiency of application of novel nanoscale drug delivery system in tumor cell lines, including drug-resistant ones. The polyethylene glycol (PEG)-modified polymeric carrier VEP-GMA used in this study, was synthesized at the Department of Organic Chemistry of Lviv National Polytechnic University. We compared the effect of free doxorubicin and of this anticancer drug immobilized on the polymeric carrier, towards human tumor cells. It was found that such immobilization of doxorubicin significantly enhanced the cytotoxic action of this drug towards human lung carcinoma A549 cells, human colorectal carcinoma HCT116 cells, human breast carcinoma MCF-7 cells and their doxorubicin-resistant MCF-7/ADR subline. The results of our studies demonstrated that using doxorubicin complex with novel polymeric nanoscale carrier VEP-GMA-PEG permitted reducing the active dose of doxorubicin in cancer cells at least 10 times, comparing with such dose of this anticancer drug used in free form. Since the antineoplastic effect of carrier-immobilized doxorubicin was maintained, these results suggest a potential reduction of negative side effects of the corresponding chemotherapy. It was shown that the uptake by tumor cells of the carrier-immobilized doxorubicin was significantly enhanced comparing with such uptake of free doxorubicin. Our data demonstrated that neither macropinocytosis, nor endocytosis can be responsible for the uptake of doxorubicin that is immobilized on the nanosized polymeric carrier. Our future experiments are focused on the improvement of characteristics of this carrier by means of its specific functionalization aimed at reaching its addressed action towards tumor cells *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: nanosized polymeric drug carriers, doxorubicin, human tumor cells, cell resistance to drugs.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОЛИГОЭЛЕКТРОЛИТНОМ ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ ВЭП-ГМА-ПЭГ ПОВЫШАЕТ СКОРОСТЬ ПОСТУПЛЕНИЯ ЭТОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА В РАКОВЫЕ КЛЕТКИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕГО ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

**Ю. В. Сенькив^{1,2,4}, А. Р. Рябцева³, П. Хеффетер⁴, Н. М. Бойко¹,
Е. А. Шляхтина¹, Н. Е. Митина³, В. Бергер⁴, О. С. Заиченко³, Р. С. Стойка¹**

¹Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

²Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

³Национальный Университет „Львовская Политехника”, пл. Св. Юра, 2, Львов 79013, Украина

⁴Институт раковых исследований, Медицинский Университет Вены
Боршкегассе, 8а, Вена 1090, Австрия
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Использование специальных систем доставки лекарственных препаратов в клетки-мишени может позволить преодолеть проблемы, возникающие в ходе лечения различных заболеваний, а именно негативные последствия неспецифического влияния лекарств на здоровые клетки организма, низкую чувствительность раковых клеток к некоторым противоопухолевым препаратам в нетоксичной для организма дозе, резистентность патогенных организмов к антибиотикам.

В работе изучали эффективность использования наноразмерной системы доставки лекарственных препаратов в клетки опухолевых линий (дикого типа и резистентных). Полимерный носитель ВЭП-ГМА, модифицированный полиэтиленгликолем, был синтезирован на кафедре органической химии Национального университета „Львовская Политехника”.

Показано, что использование полимерного носителя с иммобилизованным противоопухолевым препаратом доксорубицином приводило к существенному уменьшению прироста клеток карциномы легких A549, колоректальной карциномы HCT116, рака молочной железы MCF-7 и ее резистентной сублинии MCF-7/ADR.

Необходимо подчеркнуть, что применение полимерного носителя ВЭП-ГМА-ПЭГ позволило снизить действующую дозу доксорубицина минимум в 10 раз с сохранением антинеопластического эффекта этого препарата, который предусматривает существенное уменьшение негативных побочных эффектов такой химиотерапии. Установлено ускоренное поглощение опухолевыми клетками доксорубицина в составе транспортного комплекса с носителем, по сравнению с поглощением его свободной формы. Показано, что макропиноцитоз или эндоцитоз не задействованы в поглощении клетками таких комплексов доксорубицина с полимерным носителем. Проводятся работы по дальнейшему совершенствованию созданного наноразмерного полимерного носителя путем его дополнительной функционализации с целью повышения адресности его действия на опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: наноразмерные полимерные носители лекарств, доксорубицин, клетки опухолей человека, резистентность клеток к лекарствам.

Одержано: 13.07.2012