

ДІЯ ВІЛЬНОГО ТА ЗВ'ЯЗАНОГО З ПОЛІМЕРНИМ НОСІЄМ ДОКСОРУБІЦИНУ НА КЛІТИНИ ЛІНІЇ НСТ116 КОЛОРЕКТАЛЬНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЮДИНИ

Ю. В. СЕНЬКІВ^{1,2,4}, П. ГЕФФЕТЕР², А. О. РЯБЦЕВА³, Н. М. БОЙКО¹,
Н. Є. МІТІНА³, О. С. ЗАІЧЕНКО³, В. БЕРГЕР², Р. С. СТОЙКА¹

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів;

²Інститут ракових досліджень, Медичний університет Відня, Австрія;

³Національний університет «Львівська політехніка», Україна;

⁴Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Створення стабільних функціоналізованих нанорозмірних композитів для доставки ліків у різні типи клітин-мішеней є актуальною проблемою сучасної фармацевтики. Метою роботи було порівняти антинеопластичну дію вільного доксорубіцину і його комплексу з новим нанорозмірним полімерним носієм на клітини лінії НСТ116 колоректальної карциноми людини. Встановлено, що доставка у ці клітини доксорубіцину нанорозмірним носієм, створеним на основі полі(5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-ко-гліцидил метакрилат)-графт-поліетиленгліколь (полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР), де ВЕР – 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін, ГМА – гліцидил метакрилат і графт-ПЕР – графт-поліетиленгліколь відповідно, і додатково функціоналізованим фосфатидилхоліном, забезпечує ефективне пригнічення росту клітин у концентрації, яка приблизно в 10 разів нижча за концентрацію вільного доксорубіцину, необхідну для досягнення такого самого інгібувального ефекту. У роботі показано, що доксорубіцин, доставлений цим носієм, додатково функціоналізованим фосфатидилхоліном, інтенсивніше розщеплює репараційний ензим PARP (Poly[ADP-ribose] polymerase) і істотноше затримує ділення клітин у фазі G2/M клітинного циклу, ніж вільний доксорубіцин. При цьому сам носій не виявляє токсичної дії на досліджувані пухлинні клітини і не спричинює затримки їхнього клітинного циклу. Важливо також зазначити, що наявність делеції за обома алелями гену протеїну p53 у пухлинних клітинах-мішенях не перешкоджає антинеопластичній дії на них доксорубіцину, іммобілізованого на полімерному носії. Це свідчить про наявність p53-незалежних регуляторних шляхів дії цього комплексного протипухлинного чинника. Отже, новий нанорозмірний носій, створений на основі полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР і додатково функціоналізований фосфатидилхоліном, є перспективним засобом для доставки лікарських препаратів у клітини людини.

Ключові слова: клітини колоректальної карциноми людини, доксорубіцин, нанорозмірний полімерний носій ліків, клітинний цикл, PARP, апоптоз.

На сьогодні розробка ефективних засобів для адресної доставки лікарських препаратів у клітини-мішені тканин і органів людини вважається пріоритетнішим завданням, ніж створення нових різновидів ліків. Відомо, що понад 25% світового ринку ліків зараз представлено лікарськими препаратами із удосконаленою системою доставки їх в певні клітини організму [2, 3, 12]. Зазвичай такі форми ліків виявляють пролонговану дію, вищу біологічну доступність, а також менш негативні побічні ефекти. Протягом останніх років було створено нові ефективні форми ліків на основі полімерних нанорозмірних композитів для адресного транспортування лікарських препаратів до місця запалення чи іншого патологічного процесу. Наявність у

складі цих композитів флуоресцентної мітки дозволила прослідкувати в реальному часі за перебігом лікування на тканинному та клітинному рівнях [12].

Створено низку стабільних водних систем доставки ліків на основі функціоналізованих нанорозмірних носіїв і вивчено їхні хімічні, фізичні і біологічні взаємодії в організмі, зокрема процеси, що контролюються дифузією, просторовими, електронними та іншими факторами. Використання цих носіїв дозволило покращити біологічну сумісність, підвищити специфічність дії і знизити загальну токсичність, а також забезпечити скерованість дії нанокompозитів із лікарським препаратом, зокрема їхню здатність долати певні біологічні бар'єри, що існують в організмі. Відомо, що

впродовж одного року хіміотерапевтичного лікування хворих на рак майже у половини з них розвивається резистентність пухлинних клітин до дії різних антинеопластичних препаратів (множинна стійкість до ліків) [3]. Доставка таких препаратів у складі спеціально створених нанокомпозитів дозволила в деяких випадках подолати резистентність пухлинних клітин-мішеней до дії хіміотерапевтичних чинників, наприклад, доксорубіцину [2].

Разом із тим залишаються не до кінця вивченими механізми доставки ліків за допомогою новітніх нанокомпозитів, у першу чергу, молекулярні механізми біологічної дії найвживаніших протипухлинних препаратів [7, 11, 12].

У цій роботі було застосовано новий нанорозмірний полімерний носій, створений на основі полі(5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-ко-гліцидил метакрилат)-графт-поліетиленгліколю (полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР), де ВЕР – 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін, ГМА – гліцидил метакрилат і графт-ПЕР – графт-поліетиленгліколь відповідно, і додатково функціоналізований фосфатидилхоліном для покращення доставки доксорубіцину в клітини лінії НСТ116 колоректальної карциноми людини і підвищення ефективності дії цього відомого протипухлинного препарату. Раніше ми порівняли цитотоксичну дію доксорубіцину у вільному стані та іммобілізованому на цьому самому носії, але без фосфоліпиду в його складі, а також інтенсивність їх поглинання пухлинними клітинами і процеси апоптозу в пухлинних клітинах-мішенях [16]. Відомо, що дія доксорубіцину на клітини ссавців зумовлена кількома регуляторними чинниками, зокрема, пов'язаними з інтеркаляцією доксорубіцину в структуру ДНК, а також залежить від рівня

продукту гену р53 і від активації каспази 3. В остаточному підсумку, це призводить до запуску апоптозу в клітинах-мішенях.

Нами продемонстровано, що доксорубіцин, іммобілізований на згаданому вище полімерному носії, ефективно пригнічує ріст клітин лінії НСТ116 із делетованими алелями гену р53 колоректальної карциноми людини. Ці результати свідчать про використання альтернативних до протеїну р53 механізмів дії інкапсульованого доксорубіцину принаймні на ці клітини, а також про перспективність застосування нового нанорозмірного полімерного носія для доставки доксорубіцину в пухлинні клітини людини.

Матеріали і методи

Як носій використовували полімер полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР, синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» під керівництвом к.х.н. О. С. Заїченка. Схематичну будову цього носія представлено на рис. 1.

Склад синтезованого полімерного носія підтверджено за допомогою елементного аналізу, а вміст С, Н, N розраховано за описаними методами [23]. Вміст мономерних ланок у складі полімеру наведено в табл. 1.

Молекулярну масу ПЕР-вмісного полімеру (245 000 г/моль) визначали, виходячи із середньої молекулярної маси кополімеру полі(ВЕР-ГМА), яка дорівнює 61 100 г/моль, а також із кількості й молекулярної маси ланок ПЕР, приєднаних до основного ланцюга. Молекулярну масу кополімеру полі(ВЕР-ГМА) визначали за допомогою гелпроникної хроматографії [21] на рідинному хроматографі Waters GPC/HPLC (США) із використанням стирилгелевої колонки. Як елюент використовували тетрагідрофуран (швидкість елюції –

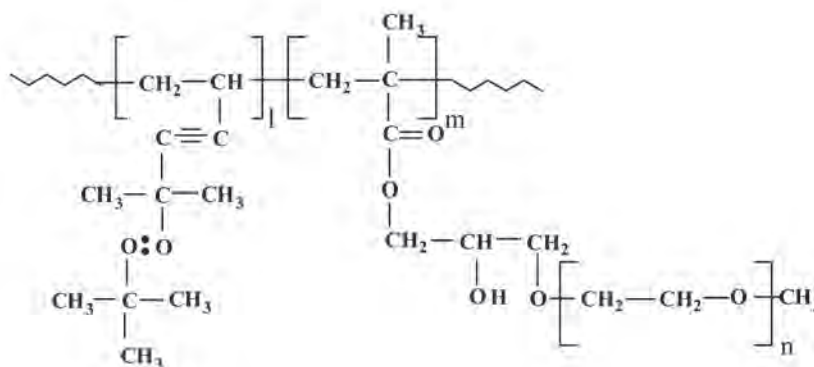


Рис. 1. Схематична будова носія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР

Таблиця 1. Вміст мономерних ланок у складі кополімеру

Вміст, % мас.		
ВЕП	ГМА	ПЕГ
0,97	23,97	75,06

1 мл/хв). Структуру одержаних кополімерів підтверджували ІЧ- та ЯМР-спектроскопією.

Характеристика носія на основі комплексу полі(ВЕП-ГМА)-графт-ПЕГ із фосфатидилхоліном (полімерний носій з поліетиленгліколем і фосфатидилхоліном, далі Пн-ПЕГ-фл). Молекули доксорубіцину утворюють із кисневими атомами частини поліетиленгліколевих ланцюгів полімерного носія водневі зв'язки, що обумовлює їх гідрофобність та утворення ядра наночастинок, в якому знаходиться доксорубіцин. Решта ланцюгів ПЕГ, які незадіяні в кон'югації з доксорубіцином, стабілізують наночастинок у воді. Співвідношення доксорубіцину, фосфатидилхоліну і носія в системі дорівнювало 1 : 1 : 30 і було визначено кондуктометричним титруванням розчину полімеру водним розчином доксорубіцину. Концентрація доксорубіцину в системі становила $3,3 \cdot 10^{-4}$ г/мл, тоді як концентрація полімерного носія – $9,9 \cdot 10^{-3}$ г/мл.

Утворення кон'югатів між доксорубіцином і носієм підтверджували за допомогою УФ-спектроскопії. Розмір частинок у водному розчині полімеру дорівнював 58,3 нм, а ξ -потенціал – +4,16 мВ, тоді як розмір частинок кон'югату доксорубіцину з полімерним носієм дорівнював 28 нм, а ξ -потенціал – +10,9 мВ.

Культивування клітин. Клітини лінії НСТ116 (сублінії р53-/- і р53+/+) колоректальної карциноми людини було отримано від доктора Берта Фогельштайна (Університет Джона Хопкінса, Балтимор, США). Клітини вирощували у стандартному середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) фірми Sigma-Aldrich (США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ глутаміну і 25 мкг/мл гентаміцину в камері термостата із 100%-ю вологістю, 5% CO₂ і 95% повітря при +37 °С. Культуральне середовище оновлювали через кожні 2–3 дні. Перед пасажуванням клітини промивали фосфатно-сольовим буфером – ФСБ (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,4 мМ KH₂PO₄, рН 7,4).

Клітини знімали з дна чашок за допомогою розчину трипсин/ЕДТА (трипсин/етилендіамінтетраацетат): 137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,03 мМ Na₂HPO₄, 0,4 мМ KH₂PO₄, 4,5 мМ NaHCO₃, 0,53 мМ ЕДТА, 0,25% трипсин, рН 7,4. Пасажування клітин здійснювали у співвідношенні 1 : 3 через кожні 3–4 дні.

Клітини були вільними від бактерій роду *Mycoplasma*, що встановлено за допомогою наборів «Mycoplasma Detection Kit MycoAlert» фірми Cambrex Bio Science (Велика Британія) і «PCR Mycoplasma Kit» фірми Applichem (Німеччина). Походження клітинних ліній було підтверджене за допомогою аналізу мікросателітної ДНК, як описано [22].

Визначення функціональної активності клітин тестом із МТТ. Для визначення впливу різноманітних чинників на проліферацію клітини висівали у 96-лунковий планшет (50 тис. клітин на лунку) та інкубували в повноцінному культуральному середовищі впродовж 12 год, щоб клітини мали змогу прикріпитися до поверхні лунок. Після цього їх промивали ФСБ, змінювали середовище на дослідне й інкубували впродовж 1, 3, 6 і 72 год. За 5 год до завершення інкубації, до середовища додавали МТТ 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліумбромід (Sigma-Aldrich, США) у кінцевій концентрації 500 мкг/мл. Після завершення інкубації середовище відбирали, а в лунки додавали диметилсульфоксид для розчинення фіолетових кристалів формазану, що утворилися внаслідок відновлення реагенту МТТ редуказами, наявними в живих клітинах. Концентрацію формазану в лунках визначали мікрофотометром (Plate Reader BioTek, США) за оптичним поглинанням при довжині хвилі 490 нм. Кількість живих клітин (у відсотках) визначали за співвідношенням величин пропускання, виміряних у лунках, в яких клітини інкубували із дослідним і контрольним середовищами.

Включення радіоактивної мітки ³H-тимідину в ДНК клітин. Клітини висівали (5·10⁴ клітин в 100 мкл культурального середовища на лунку) в 96-лункові планшети. Препарати додавали після інкубування клітин при 37 °С протягом 24 год. Для оцінки впливу препаратів на синтез ДНК клітини тричі промивали ФСБ і додавали до них 100 мкл розчину 2 нМ ³H-тимідину (GE Healthcare, США), після чого клітини інкубували протягом 3 год при 37 °С. Потім клітини промивали три рази 100 мкл ФСБ і лізували у 100 мкл буфера для лізування. Клітинні лізати переносили в пробірки для визначен-

ня рівня сцинтиляції. Лунки промивали один раз 100 мкл ФСБ й одержану аліквоту також додавали до відповідних клітинних лізатів. До зразків додавали 2 мл сцинтиляційного розчину і зміст перемішували, струшуючи пробірки. Радіоактивність проб вимірювали на рідинному сцинтиляційному аналізаторі Tri-Carb 1900TR (Packard, США) й одержані показники представляли, як значення IC_{50} , розраховане за допомогою програми GraphPad Prism 5.0.

Вестерн-блот аналіз клітинних протеїнів. Клітини висівали у 6-лункові планшети ($2 \cdot 10^5$ клітин/лунку) і залишали на ніч в CO_2 -інкубаторі для прикріплення їх до поверхні лунок. Потім до культурального середовища додавали вільний доксорубіцин, доксорубіцин, іммобілізований на носії, або чистий носій в заданих концентраціях. Інкубація з досліджуваними препаратами тривала 24 год. Вестерн-блот аналіз проводили за описаною методикою [8].

Антитіла до досліджуваних клітинних протеїнів розводили 2%-им розчином БСА у ФСБ із 0,05% Твіну-20 у співвідношенні, вказаному в табл. 2. Після інкубації мембрану промивали тричі по 5 хв у ФСБ з 0,05% Твіну-20, а далі інкубували у присутності мічених пероксидазою антитіл до кролячого імуноглобуліну (Amersham Pharmacia Biotech, США). Антитіла розводили блокувальним розчином у співвідношенні 1 : 5000. Інкубацію мембран проводили протягом 1 год при 4 °С на гойдалці. Після інкубації мембрану промивали (тричі по 5 хв) ФСБ із 0,05% твіну-20. Рівномірність нанесення зразків протеїнів визначали за результатами інкубації мембрани з антитілами до β -актину (протеїн «домашнього господарства», експресія якого вважається приблизно однаковою в усіх типах клітин).

Зони зв'язування мічених пероксидазою антитіл із клітинними протеїнами

виявляли за допомогою хемілюмінесценції. Для цього рентгенівську плівку занурювали у стандартний фенідон-гідрохіноновий проявник, після чого її обробляли кислим фіксажем. Зони зв'язування антитіл виявлялися на рентгенівській плівці як темні смуги. Нормалізацію кількості нанесеного для електрофорезу протеїну проводили відносно рівня β -актину в тих самих зразках.

Дослідження клітинного циклу. Після завершення інкубації клітини знімали з дна чашок за допомогою розчину трипсин/ЕДТА й осаджували центрифугуванням при 1 000 g протягом 5 хв при температурі 4 °С. Суспензію клітин в охолодженому ФСБ готували із розрахунку 1 млн. клітин на 1 мл розчину. Клітини фіксували охолодженим метанолом впродовж 12 год при температурі -20 °С. Перед фарбуванням зафіксовані клітини знову промивали ФСБ і готували суспензію клітин із розрахунку 2 млн. клітин на зразок. Суспензію клітин переносили в пробірку для аналізу, додавали РНКазу А (Fermentas, Литва) до кінцевої концентрації 100 мкг/мл та інкубували впродовж 30 хв при температурі 37 °С. Після цього клітини фарбували розчином йодиду пропідію (Sigma-Aldrich, США) у кінцевій концентрації 50 мкг/мл. Результати аналізували за допомогою протокового цитофлуориметра (BD Biosciences, США).

Аналіз одержаних ДНК-гістограм для визначення розподілу клітин за стадіями мітотичного циклу здійснювали, використовуючи програмне забезпечення «Multicycle DNA content and cell cycle analysis software for Windows» фірми Phoenix Flow Systems (США).

Статистичний аналіз експериментальних даних. Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта експериментальних і контрольних умов. Дані представлено у вигляді $M \pm m$, де M – середнє значення, а m – середня по-

Таблиця 2. Перелік первинних антитіл, використаних у роботі

Антиген	Розведення	Фірма-виробник антитіл
Розщеплений PARP*	1 : 1000	Cell Signalling (США)
β -актин (AC-15)	1 : 5000	Sigma-Aldrich (США)
Cyclin A	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology (США)
Cyclin D1	1 : 100	--/--/--
Chk1	1 : 1000	--/--/--
Phospho-Chk1 (Ser 345)	1 : 1000	--/--/--

*Умовні позначення: PARP – polyADP-ribose polymerase (поліADP-рибоза полімераза – ензим, який бере участь у репарації ДНК)

хибка, розрахована за результатами трьох вимірювань в одному із декількох однотипових експериментів. Порівняння двох мінливих величин здійснювали на підставі показника статистичної вірогідності відмінностей «*P*». Показник «*P*» розраховували за критерієм Стюдента, який визначали за допомогою *t*-тесту для двох вибірок даних із різними величинами дисперсії σ^2 . Відмінність між двома величинами вважали статистично вірогідною, коли величина $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Як об'єкт для порівняльного дослідження антинеопластичної дії вільного доксорубіцину й іммобілізованого на новому нанорозмірному полімерному носії, що був додатково функціоналізований фосфатидилхоліном, використовували клітини лінії НСТ116 колоректальної карциноми людини. У табл. 3 наведені дані вивчення цитотоксичної дії цих двох лікарських форм доксорубіцину щодо клітин із нормальним і дефектним функціонуванням гену протеїну p53. Враховуючи більший інтерес дослідників до результатів дії іммобілізованого на носії доксорубіцину саме на пухлинні клітини із делецією гену протеїну p53, у подальшій роботі ми використовували як тест-систему саме сублінію p53-/- клітин НСТ116, адже відомо, що клітини понад 50% злоякісних пухлин людини мають мутації в гені p53, що призводить до інактивації його протеїнового продукту [18]. Одержані нами дані свідчать про те, що доксорубіцин значно менше пригнічує ріст клітин із нокаутом гену p53 ($IC_{50} = 456,6 \pm 3,4$ нМ) порівняно із пригніченням росту клітин із нормальними алелями цього гену ($IC_{50} = 75,2 \pm 4,2$ нМ). Доставка доксорубіцину новим нанорозмірним носієм істотно знижує значення IC_{50} (концентрація препарату, за якої виникає 50%-не інгібування функціональної активності клітин) в обох типах клітин лінії НСТ116, що свідчить про підвищення ефективності дії комплексу доксорубіцину з носієм. Важливо за-

значити, що кратність зростання ефективності цитотоксичної дії доксорубіцину (показник IC_{50}) за умов його доставки носієм у клітини із нокаутом гену p53 є вищою (10,8), ніж така кратність (показник IC_{50}) за дії вільного доксорубіцину (6,0) на ці самі клітини. Отже, хоча дефіцит гену p53 у пухлинних клітинах істотно (у 6 разів) знижує їхню чутливість до дії доксорубіцину, за умов доставки цього препарату новим носієм зазначена різниця помітно зменшується (у 3,3 раза). Враховуючи сукупність наведених вище аргументів, усю подальшу роботу із дослідження механізмів дії вільного та інкапсульованого в носії доксорубіцину ми проводили саме на клітинній лінії НСТ116 (p53-/-).

Після дії досліджуваних препаратів на клітини лінії НСТ116 p53-/- протягом 1, 3, 6, 24, 48 і 72 год застосовували тест МТТ для визначення функціональної активності клітин, що залежала від їхньої кількості і життєздатності. З рис. 2 (А, Б) видно, що через 72 год інкубації клітин із вільним доксорубіцином його IC_{50} становить 456,6 нМ, тоді як IC_{50} доксорубіцину, іммобілізованого на носії Пн-ПЕГ-фл, складає 42,1 нМ.

Отже, іммобілізація доксорубіцину на новому полімерному носії дозволяє приблизно у 10 разів знизити IC_{50} цього протипухлинного препарату, тобто на порядок підвищує ефективність його цитотоксичної дії (рис. 2, А, Б). При цьому сам полімерний носій не виявляє вираженого цитотоксичного ефекту (рис. 2, В).

Цитотоксична дія двох різних форм доксорубіцину, визначена через 1, 3, 6, 24 і 48 год, характеризується чіткою залежністю від часу (дані не наведено). На рис. 3 представлені результати порівняльного дослідження цитотоксичної дії двох форм доксорубіцину – вільної та іммобілізованої – із врахуванням двох змінних показників – концентрації препарату (50, 100, 150, 200 і 250 нМ) і тривалості його дії (24, 48 і 72 год) на клітини лінії НСТ116. Як видно, цитотоксичний ефект

Таблиця 3. Проліферативна активність пухлинних клітин лінії НСТ116 за дії (72 год) вільного доксорубіцину і його комплексу із полімерним носієм

Лінія клітин	Доксорубіцин		Пн-ПЕГ-фл-Докс		Кратність зростання активності доксорубіцину, доставленого носієм
	IC_{50} , нМ	$\pm SD$	IC_{50} , нМ	$\pm SD$	
НСТ116 (p53+/+)	75,2	4,2	12,6	0,6	6
НСТ116 (p53-/-)	456,6	3,4	42,1	1,6	10,8

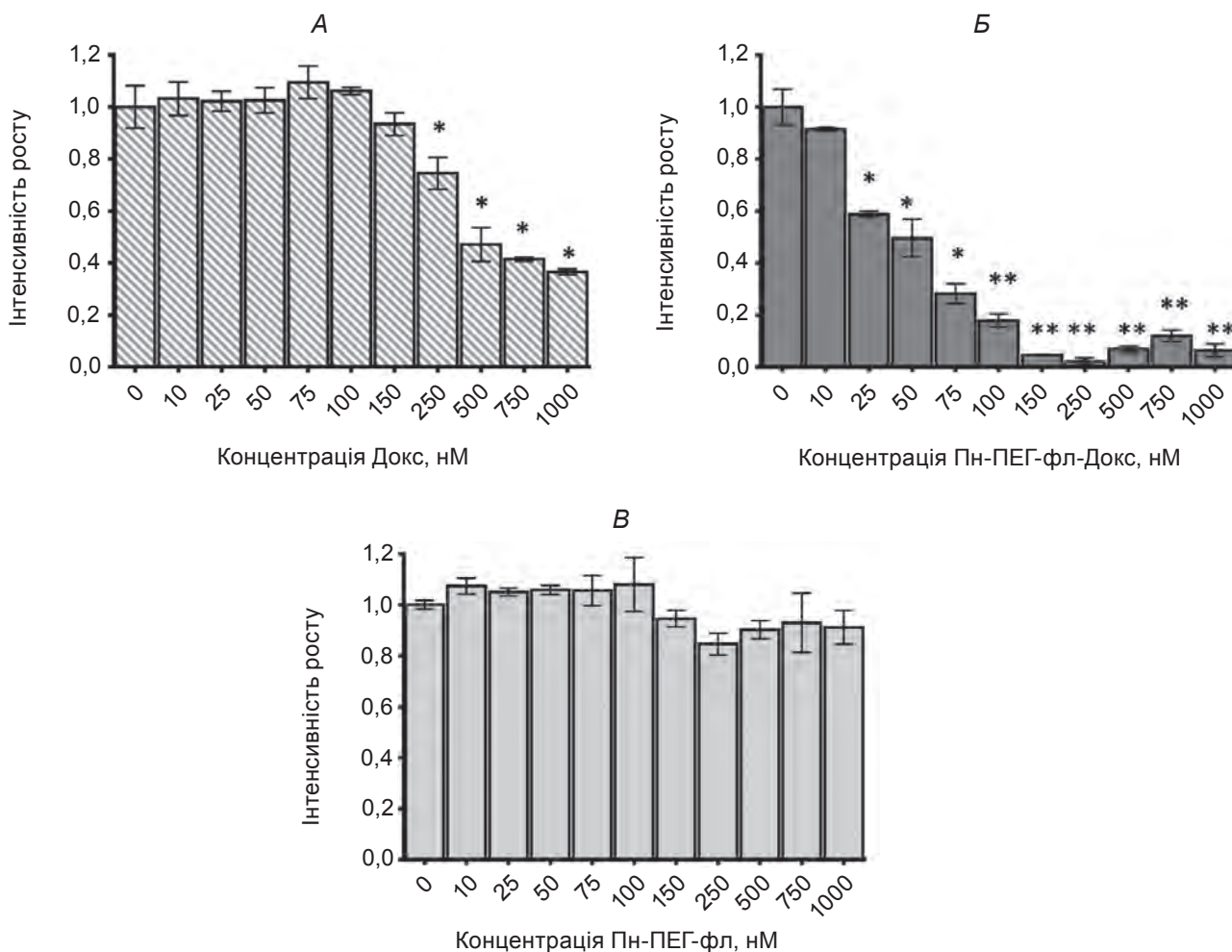


Рис. 2. Динаміка росту клітин лінії НСТ116 (p53-/-) колоректальної карциноми людини залежно від діючої концентрації вільного доксорубіцину (А), доксорубіцину, іммобілізованого на носії (Б), і самого носія Пн-ПЕГ-фл (В). Тривалість дії кожного із препаратів – 72 год. По осі ординат – показник росту клітин як частка від контролю, прийнятого за 1,0. *P < 0,05, **P < 0,01

доксорубіцину, іммобілізованого на носії, виявлено вже через 24 год, а у разі використання вільного доксорубіцину він досягається значно пізніше, а саме через 72 год.

Щоб підтвердити на молекулярному рівні результати цитофункціонального дослідження (МТТ-тест) ефективності цитотоксичної дії створеної системи доставки доксорубіцину в клітини-мішені, було проведено вестерн-блот аналіз вмісту репараційного ензиму PARP-1 у клітинах-мішенях. Відомо, що за індукції апоптозу PARP-1 розщеплюється ефекторною каспазою-3 [1]. Інкубацію клітин лінії НСТ116 проводили протягом 24 год у середовищі з вільним доксорубіцином (100, 250 і 500 нМ), із доксорубіцином, іммобілізованим на носії (10, 25 і 50 нМ), а також із вільним носієм (25 і 50 нМ) (рис. 4).

Як видно з даних на рис. 4, кількість розщепленого протеїну PARP-1 у клітинах лінії НСТ116 за дії доксорубіцину, іммобілізованого на полімерному носії, є значно вищою, ніж його кількість за дії вільного доксорубіцину. Співвідношення діючих концентрацій вільного та іммобілізованого доксорубіцину, необхідних для досягнення подібного рівня розщеплення протеїну PARP-1, становить приблизно 10. Таким чином слід використати у 10 разів вищу дозу вільного доксорубіцину, щоб забезпечити таке саме за інтенсивністю розщеплення PARP-1, як за дії його полімерної форми.

Наступним етапом дослідження було порівняти інтенсивність синтезу ДНК у клітинах-мішенях під впливом двох різних форм застосування доксорубіцину. Для цього клітини лінії НСТ116 інкубували протягом

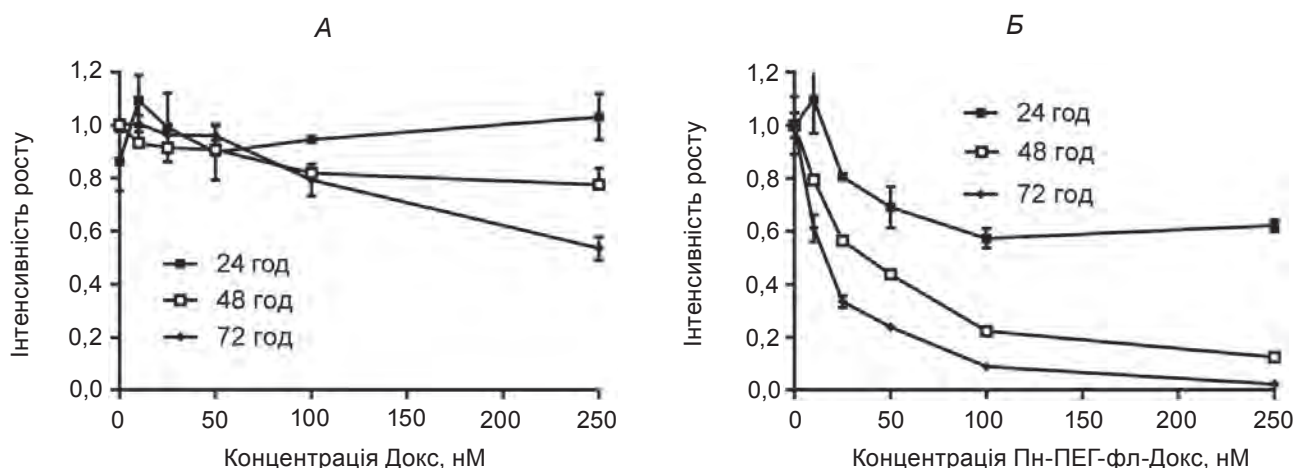


Рис. 3. Динаміка росту клітин НСТ116 (p53^{-/-}) колоректальної карциноми людини залежно від діючої концентрації вільного доксорубіцину (А) і доксорубіцину, іммобілізованого на носії (Б). Тривалість дії кожного із препаратів складала 24, 48 та 72 год. На осі ординат – показник росту клітин, як частка від контролю, прийнятого за 1,0. Вірогідність змін, показаних на рис. 3, А, становить $P < 0,05$ у точці 250 нМ на 72 год, а на рис. 3, Б – $P < 0,01$ у точках 25–250 нМ на 48 і 72 год і $P < 0,01$ – у точках 100–250 нМ на 24 год

3 год у присутності вільного доксорубіцину або його комплексу із полімерним носієм, після чого додавали на 1 год імпульсну мітку ³Н-тимідину. Результати, наведені на рис. 5, свідчать про те, що за всіх використаних концентрацій доксорубіцину (25, 50 і 100 нМ) інтенсивність включення ³Н-тимідину в ДНК клітин, які піддавалися дії полімерної форми цього протипухлинного препарату, є суттєво нижчою, ніж у разі дії вільного доксорубіцину.

Зазвичай зміни активності синтезу ДНК поєднуються із затримкою клітинного циклу. Дослідження останнього проводили на клітинах лінії НСТ116 (p53^{-/-}), використовуючи протокову цитофлуориметрію (рис. 6). Встановлено, що іммобілізація доксорубіцину на носії полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ, функціоналізованому фосfolіпідом, призводить до зупинки клітин у фазі G2/M (рис. 6).

При цьому сам носій не спричинює істотних змін у розподілі фаз клітинного циклу. Відомо, що репарація пошкоджень ДНК відбувається у фазі G2 перед тим, як клітини вступають у фазу мітозу. Також показано, що у тому разі, коли пошкодження ДНК відбувається в злоякісних клітинах під впливом протипухлинних препаратів, що діють у фазі G1, це може призводити до нагромадження клітин у фазі G2/M [9].

Нами проведено вестерн-блот аналіз протеїнів, задіяних у регуляції клітинного циклу. Одним з молекулярних маркерів слугував протеїн Chk1, активація якого відбувається шляхом фосфорилування залишків Ser317 і Ser345 у відповідь на певні генотоксичні стреси [20]. Зокрема, фосфорилування залишку Ser345 слугує сигналом, який визначає ядерну локалізацію активованого Chk1, що

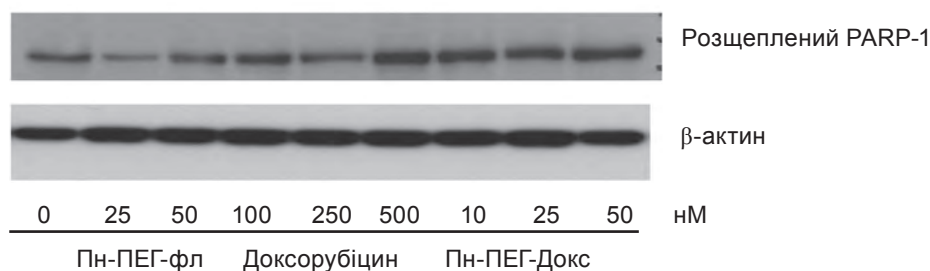


Рис. 4. Результати вестерн-блот аналізу вмісту розщепленої форми репараційного ензиму PARP-1 у клітинах лінії НСТ116 (p53^{-/-}) за дії на них досліджуваного полімерного носія, доксорубіцину у вільній формі і доксорубіцину, іммобілізованого на полімерному носії

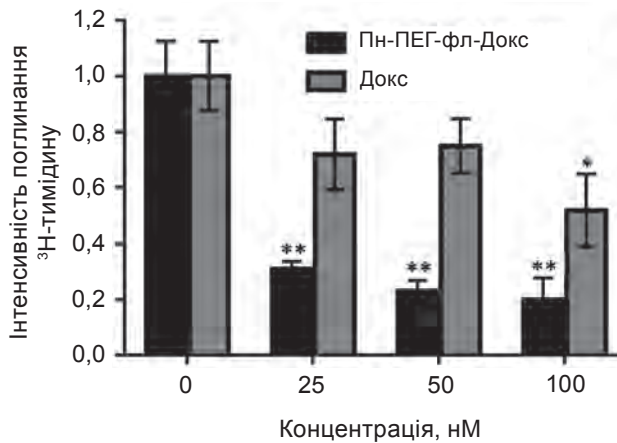


Рис. 5. Інтенсивність включення ³H-тимідину в ДНК клітин лінії НСТ116 (p53-/-) колоректальної карциноми людини за дії вільного та іммобілізованого на полімерному носії доксорубіцину. На осі ординат – відносний рівень включення ³H-тимідину в ДНК клітин у частках до контролю, прийнятого за 1,0. *P < 0,05, **P < 0,01

призводить до зупинки клітинного циклу у фазі G2/M [7]. Інший регулятор клітинного циклу – протеїн Cdc25C – активує комплекс циклін–B–Cdk1, тоді як регуляторна підсистема Wee1 інгібує його. Існують також реципрокні взаємозв'язки між цими регуляторними чинниками, оскільки циклін–B–Cdk1 здатен активувати Cdc25C та інгібувати Wee1 [13, 1]. Модель «подвійного замка» передбачає, що у разі виникнення пошкоджень ДНК майже одночасно відбуваються процеси активації Wee1 та інгібування Cdc25C. Wee1 «вимикає» функціонування Cdk1 і цей стан підтримується у клітині за рахунок інактивації Cdc25C.

Нами виявлено зростання рівня фосфорилювання залишку Ser345 у протеїні Chk1, що може свідчити про затримку клітин у фазі G2/M. На це також вказує зниження рівня експресії цикліну D1. Рівень цикліну A після 24-годинної інкубації досліджуваних клітин із Пн-ПЕГ-фл-Докс (концентрація доксорубіцину – 50 нМ) не змінюється. На противагу цьому ми не виявили істотних змін рівня цикліну A за дії вільного доксорубіцину, навіть у такій високій концентрації як 500 нМ.

Різноманітні системи покращеної доставки ліків в організмі на сьогодні все ширше впроваджуються в медичну практику. Для цієї мети використовують як ліпосомні носії, так і полімерні міцели та розгалужені полімери [4]. Вказані матеріали особливо корисні для доставки у клітини-мішені нерозчинних або по-

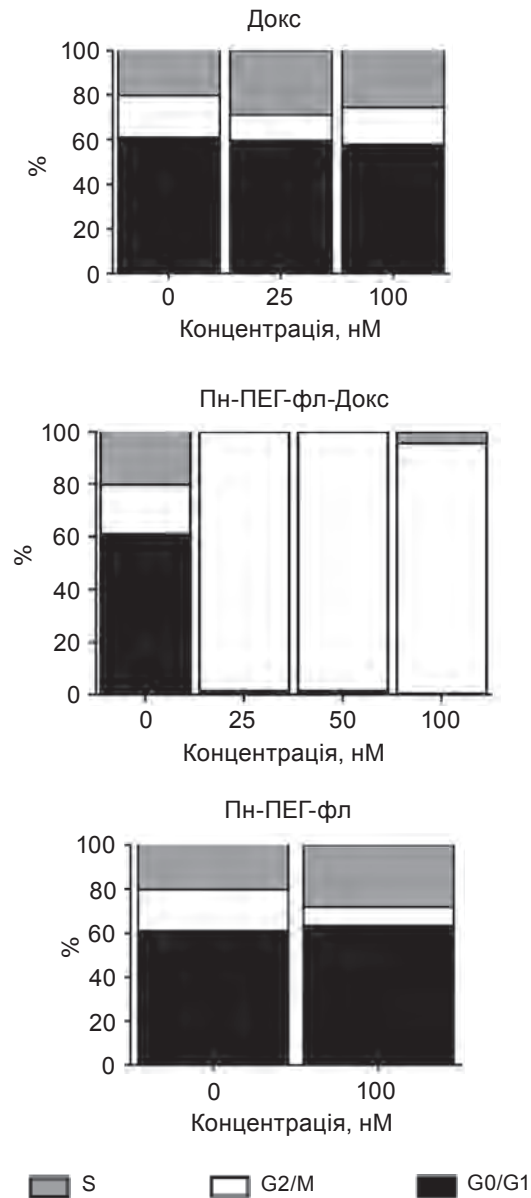


Рис. 6. Розподіл за фазами клітинного циклу в клітинах лінії НСТ116 (p53-/-) за дії (24 год) вільного та іммобілізованого на полімерному носії доксорубіцину, а також дії самого носія

гано розчинних лікарських препаратів. Крім того, вони захищають ліки від передчасної деградації і зменшують їх загальний токсичний вплив на нормальні тканини та органи. Наночастинки, до складу яких включений поліетиленгліколь (ПЕГ), гірше взаємодіють з опсонінами і це забезпечує їх захист від передчасного поглинання макрофагами, тобто збільшує тривалість циркулювання нанокompatивів в організмі [2].

Інкапсуляція антрациклінових антибіотиків, включно з доксорубіцином, у різні

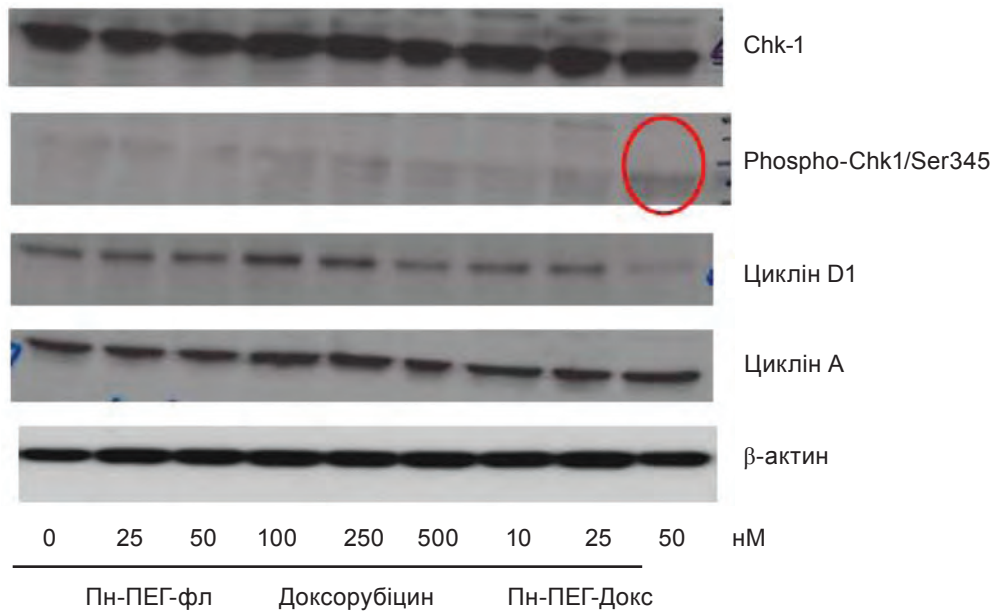


Рис. 7. Результати вестерн-блот аналізу протеїнів, задіяних у регуляції клітинного циклу в клітинах лінії НСТ116 (p53^{-/-}) за дії доксорубіцину у вільній формі та в комплексі з полімерним носієм

нанокомпозити є однією з найуспішніших стратегій, які зараз використовуються для покращення фармакологічних характеристик цих протипухлинних препаратів, зокрема, щоб зменшити проявлення його негативних побічних ефектів. У науковій літературі описано низку полімерних носіїв для доставки доксорубіцину. Їх використання дозволило значною мірою домогтися подолання резистентності певних пухлинних клітин до цього препарату [5, 11, 19].

Полімерний носій, застосований в нашій роботі, є не лише малотоксичним [5], але й дозволяє відносно легко здійснювати його подальшу біофункціоналізацію з метою покращення біосумісності та підвищення адресності його дії в організмі. Це стало можливим завдяки включенню фосфоліпиду (фосфадитилхоліну) в молекулу синтезованого ПЕГ-вмісного полімеру. Відомо, що багато створених на сьогодні наночастинок, які містять ПЕГ, характеризуються зниженою здатністю зв'язуватися із протеїнами плазми крові та імунними клітинами, і це, значною мірою, захищає їх від руйнування макрофагами. Зазвичай, ПЕГ-вмісні нанокомпозити, наприклад, ліпосомний протипухлинний препарат Doxil, не поглинаються шляхом ендцитозу клітинами-мішенями. Їхня біологічна активність базується на повільному вивільненні відповідних протипухлинних препаратів у інтерстиціальний простір [6]. Тому у більшості

випадків такі нанокомпозити мають незначну активність щодо клітин-мішеней в умовах *in vitro*.

Завдяки поєднанню полімерної і фосфоліпідної структур комплекси доксорубіцину з носієм, використані в цій роботі, виявляють високу антинеопластичну дію. Крім того, такі комплекси є достатньо стабільними і навіть протягом кількох місяців (до півроку) перебування в розчині доксорубіцин може залишатися зв'язаним із носієм, не вивільняючись передчасно до його поглинання пухлинними клітинами (власні спостереження). Можливо, деякі з цих властивостей зв'язаного з полімерним носієм доксорубіцину, обумовлені позитивним зарядом його нанорозмірних комплексів (див. розділ «Матеріали і методи»), адже молекули інших полімерних носіїв, що містять ПЕГ, які описані в літературі [10], мають негативний заряд. На користь такого припущення свідчать також наші дані [16] про значно швидше поглинання інкапсульованого доксорубіцину порівняно з поглинанням його вільної форми. Для остаточної відповіді на питання, що діється із самим носієм після вивільнення іммобілізованого доксорубіцину, необхідні додаткові дослідження, які розпочато нами зі створення флуоресцентно міченого полімерного носія.

Таким чином, нами виявлено приблизно десятикратне зростання антинеопластичної

дії доксорубіцину *in vitro* в умовах його доставки в клітини у складі полімерного комплексу з Пн-ПЕГ-Фл порівняно з дією вільного доксорубіцину. Ці результати, в основному, узгоджуються з даними щодо дії ліпід-полімерних гібридів [17], а також полісорбат-80-вмісних нанорозмірних частинок [15]. У цитованих роботах показано, що включення ліпідів або поверхневоактивних речовин у структуру нанорозмірного полімеру призводить до ефективнішого поглинання доксорубіцину клітинами-мішенями. Разом з тим, зростання загальної кількості поглиненого доксорубіцину і підвищення його протипухлинної активності було значно меншим порівняно із 10-кратним підвищенням цих показників, які ми спостерігали за використання доксорубіцину, іммобілізованого на полімерному носії, що функціоналізовано фосфоліпідом.

Вважаємо, що подальший розвиток ідей про взаємозалежність між розміром, хімічною будовою, колоїдно-хімічними і фізичними властивостями і функціональністю новітніх олігоелектролітних наноконструкцій, з одного боку, та їхньою здатністю слугувати носіями для доставки ліків, з другого, є абсолютно необхідним для створення нового покоління носіїв протипухлинних препаратів, які можуть долати резистентність до них злоякісних клітин [12].

Отже, доксорубіцин, іммобілізований на новому нанорозмірному полімерному носії полі(ВЭП-ГМА)-графт-ПЕГ, цитотоксично діє *in vitro* на клітини лінії НСТ116 (p53-/-) колоректальної карциноми людини в дозі, яка приблизно у 10 разів нижча за дозу вільного доксорубіцину, і є необхідною для досягнення рівноцінного цитотоксичного ефекту. Такий інкапсульований доксорубіцин значно швидше проникає в пухлинні клітини-мішені, ніж препарат у вільній формі. Іммобілізований на полімерному носії доксорубіцин індукує суттєвіші, ніж вільний доксорубіцин, зміни в структурі клітинного циклу злоякісних клітин досліджуваної лінії, зокрема їхню зупинку на стадії G2/M. Хоча клітини лінії НСТ116 із делецією гену протеїну p53 менш чутливі, ніж інтактні клітини цієї лінії до цитотоксичної дії вільного доксорубіцину, проте за дії комплексу доксорубіцину із полімерним носієм ця різниця між згаданими типами клітин істотно зменшується за рахунок значнішого зростання чутливості до доксорубіцину пухлинних клітин із делецією гену p53.

ДЕЙСТВИЕ СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО С ПОЛИМЕРНЫМ НОСИТЕЛЕМ ДОКСОРУБИЦИНА НА КЛЕТКИ ЛИНИИ НСТ116 КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Ю. В. Сенькив^{1,2,4}, П. Геффетер²,
А. А. Рябцева³, Н. Н. Бойко¹,
Н. Е. Митина³, А. С. Заиченко³,
В. Бергер², Р. С. Стойка¹

¹Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;

²Институт раковых исследований,

Медицинский университет Вены, Австрия;

³Национальный университет «Львовская политехника», Украина;

⁴Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Украина;

e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Создание стабильных функционализированных наноразмерных композитов для доставки лекарств в различные типы клеток-мишеней является актуальной проблемой современной фармацевтики. Целью данной работы было сравнить антинеопластическое действие свободного доксорубицина и его комплекса с новым наноразмерным полимерным носителем на клетки линии НСТ116 колоректальной карциномы человека. Установлено, что доставка в эти клетки доксорубицина наноразмерным носителем, созданным на основе поли(5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ин-ко-глицидил метакрилат)-графт-полиэтиленгликоль (поли(ВЭП-ГМА)-графт-ПЭГ), где ВЭП – 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ин, ГМА – глицидил метакрилат; графт-ПЭГ – графт-полиэтиленгликоль соответственно, и дополнительно функционализированным фосфатидилхолином, обеспечивает эффективное подавление роста клеток в концентрации, примерно в 10 раз ниже концентрации свободного доксорубицина, необходимой для достижения такого же ингибирующего эффекта. В работе показано, что доксорубицин, доставленный этим носителем, дополнительно функционализированным фосфатидилхолином, интенсивнее расщепляет репарационный фермент PARP (Poly [ADP-ribose] polymerase) и существенно задерживает деление клеток в фазе G2/M клеточного цикла, чем свободный доксорубицин. При этом сам носитель не обладает токсическим действием на исследуемые опухолевые клетки и не вызывает задержки их клеточного цикла. Важно также отметить, что

наличие делеции по обоим аллелям гена протеина p53 в опухолевых клетках-мишенях не препятствует антинеопластическому действию на них доxorубина, иммобилизованного на полимерном носителе. Это свидетельствует о существовании p53-независимых регуляторных путей воздействия этого комплексного противоопухолевого фактора. Таким образом, новый наноразмерный носитель, созданный на основе поли(ВЭП-ГМА)-графт-ПЭГ и дополнительно функционализированный фосфатидилхолином, является перспективным средством для доставки лекарственных препаратов в клетки человека.

Ключевые слова: клетки колоректальной карциномы человека, доxorубин, наноразмерный полимерный носитель лекарств, клеточный цикл, PARP, апоптоз.

ACTION OF FREE AND POLYMER CARRIER ENCAPSULATED DOXORUBICIN TOWARDS HCT116 CELLS OF HUMAN COLORECTAL CARCINOMA

*Yu. V. Senkiv^{1,2,4}, P. Heffeter²,
A. O. Riabtseva³, N. M. Boiko¹,
O. S. Zaichenko³, N. Ye. Mitina³,
W. Berger², R. S. Stoika¹*

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

²Institute for Cancer Research, Medical University of Vienna, Austria;

³National University Lviv Polytechnic, Ukraine;

⁴Ivan Franko Lviv National University, Ukraine;
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Development of novel nanoscale functionalized carriers is nowadays one of the most urgent problems in cancer treatment.

The aim of our study was to compare the antineoplastic effect of free doxorubicin and its complex with a nanoscale polymeric carrier towards HCT116 colorectal carcinoma cells. It was established that application of the complex of poly(5-tret-butylperoxy)-5-methyl-1-hexene-3-in-co-glycidyl metacrylat)-graft-polyethyleneglycol (poly(VEP-GMA-PEG)-graft-PEG), where VEP – 5-tret-butylperoxy)-5-methyl-1-hexene-3-in; GMA – glycidyl metacrylat; graft-PEG – graft-polyethyleneglycol accordingly, functionalized with phosphatidylcholine for doxorubicin delivery increased 10 times the efficiency of cytotoxic action of this drug, as compared with such efficiency in case of the action of free doxorubicin. The encapsulated form of doxorubicin caused

more intensive cleavage of the reparation enzyme PARP and longer delay in G2/M cell cycle arrest, compared to such effects of free doxorubicin. The developed carrier itself is non-toxic to the used mammalian cells and does not cause impairment in their cell cycle. A deletion in both alleles of p53 gene did not affect the antineoplastic action of doxorubicin that was immobilized on the nanoscale carrier. Thus, p53-dependent signaling pathways are not involved in the cytotoxic action of doxorubicin-carrier complex. It is suggested that novel nanoscale polymeric carrier poly(VEP-GMA-PEG)-graft-PEG functionalized with phosphatidylcholine could be a promising carrier for targeted delivery of anticancer drugs.

Key words: human colorectal carcinoma cells, doxorubicin, nanoscale polymeric drug carrier, cell cycle, PARP, apoptosis.

1. Aguda B. D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**. – P. 11352–11357.
2. Basu S., Harfouche R., Soni S. et al. // Ibid. – 2009. – **106**, N 19. – P. 7957–7961.
3. Clavinas H., Crajcsi P., Cserepes J. et al. // Curr. Drug Deliv. – 2004. – **1**. – P. 27–42.
4. Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. // Nat. Rev. Cancer. – 2002. – **2**, N 1. – P. 48–58.
5. Horák D., Shagotova T., Mitina N. et al. // Chem. Mater. – 2011. – **23**, N 10. – P. 2637–2649.
6. Hu C. M., Zhang L. // Biochem. Pharmacol. – 2012. – **83**. – P. 1104–1111.
7. Jiang K., Pereira E., Maxfield M. et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**. – P. 25207–25217.
8. Laemmli U. // Nature. – 1970. – **227**. – P. 680–684.
9. Lee J. G., Kim J. H., Ahn J. H. et al. // Food. Chem. Toxicol. – 2012 Dec 26. – doi: 10.1016/j.fct.2012.12.026. [Epub ahead of print].
10. Locatelli E., Broggi F., Ponti J. et al. // Adv. Healthc. Mater. – 2012. – **1**, N 3. – P. 342–347.
11. Magnarin M., Morelli M., Rosati A. et al. // Eur. J. Pharmacol. – 2004. – **483**. – P. 19–28.
12. Manabe N., Hoshino A., Liang Y. Q. et al. // IEEE Trans. Nanobioscience. – 2006. – **5**, N 4. – P. 263–267.
13. O'Connell M. J., Walworth N. C., Carr A. M. // Trends Cell Biol. – 2000. – **10**. – P. 296–303.
14. Peterson G. L. // Anal. Biochem. – 1977. – **83**, N 2. – P. 346–358.
15. Ramge P., Unger R. E., Oltrogge J. B. et al. // Eur. J. – 2000. – **12**, N 6. – P. 1931–1940.
16. Senkiv Yu V., Ryabtseva A. R., Heffeter P. et al. // Studia Biologica. – 2012. – **6**, N 2. – P. 5–16.

17. *Wong H. L., Bendayan R., Rauth A. M. et al.* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – **3173**. – P. 1372–1381.
18. *Wu B., Li W., Qian C. et al.* // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2012. – **16**, N 9. – P. 1243–1248.
19. *Zaichenko, A., Mitina N., Shevchuk O. et al.* // *AIP Conf. Proc.* – 2010. – **1275**. – P. 178–182.
20. *Zhao H., Pivnicka-Worms H.* // *Mol. Cell Biol.* – 2001. – **21**. – P. 4129–4139.
21. *Рабек Я.* Экспериментальные методы в химии полимеров. Часть 1, 2. – М.: Мир, 1983. – 862 с.
22. *Сопін Є. Ф., Виноградова Р. П.* Основи біохімічних методів дослідження. – К.: Вища школа. – 1975. – 244 с.
23. *Торопцева А. М.* Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений. – Л.: Химия, 1972. – 416 с.

Отримано 22.11.2012