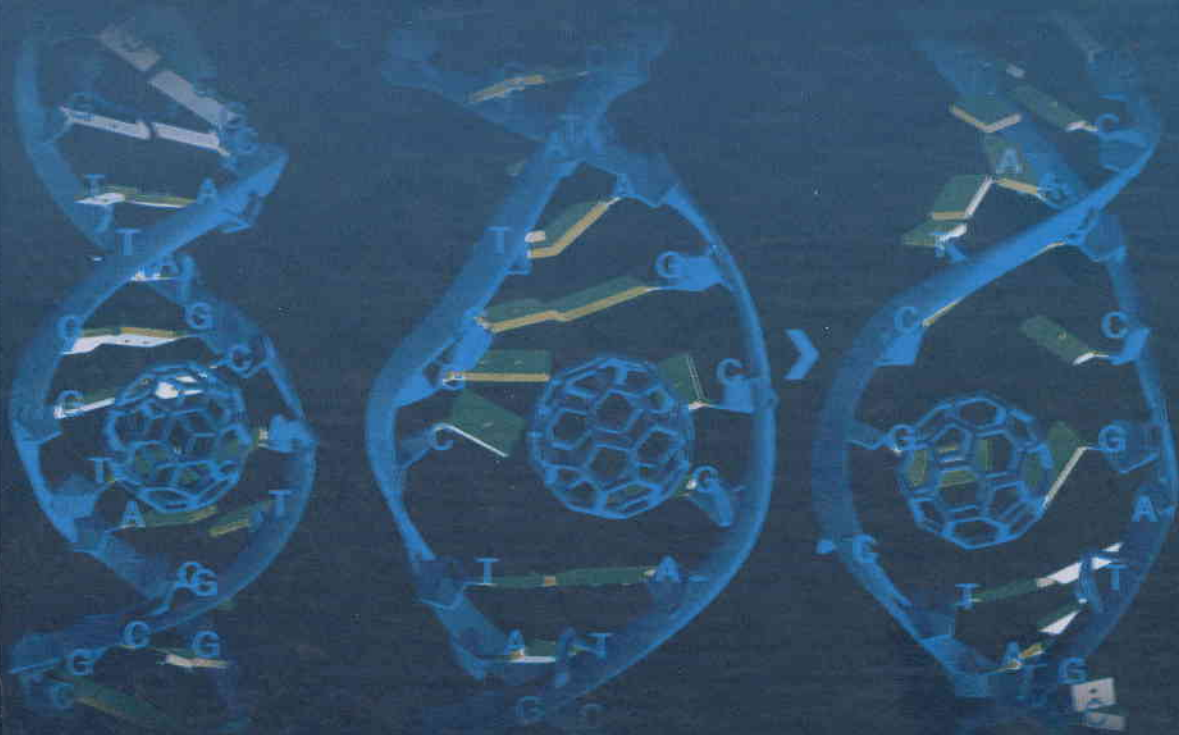


БАГАТОФУНКЦІОНАЛЬНІ НАНОМАТЕРІАЛИ ДЛЯ БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНИ

молекулярний дизайн,
синтез і застосування



АНГЛІЙСЬКА
НАУКОВА АКАДЕМІЯ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ДОСЛІДНИЙ ЦЕНТР

MULTIFUNCTIONAL NANOMATERIALS FOR BIOLOGY AND MEDICINE: molecular design, synthesis and application

Edited by R.S. STOIKA,
Corresponding Member of NAS of Ukraine

*"SCIENTIFIC BOOK"
PROJECT*

KYIV
• NAUKOVA DUMKA •
2017

БАГ

М
С

КИЇВ
• НАУКОВА ДУМКА •
2017

ПРОЕКТ
"НАУКОВА КНИГА"

За редакцією члена-кореспондента
НАН України Р.С. СТОЙКИ

**БАГАТОФУНКЦІОНАЛЬНІ
НАНОМАТЕРІАЛИ
ДЛЯ БІОЛОГІЇ
І МЕДИЦИНИ:
МОДЕКУВАННЯ ДИЗАЙН,
СИНТЕЗ І ЗАСТОСУВАННЯ**

Автори:

Р.С. Стойка, Ю.І. Прилуцький, А.Г. Наумовсь, Р.О. Білий, Я.Б. Блом, П.М. Бойко, А.П. Бурлака, Ю.В. Вац, Т.Я. Вітак, А. Волошиновський, Г.З. Гайда, О. Гевусь, Л.Л. Гнатишина, О.І. Годована, О.В. Годованій, М.В. Гончар, І.І. Гринюк, Є.А. Гудзь, Н.М. Гула, О.В. Дмитренко, Л.Б. Дробот, М.П. Євстігнєєв, А.І. Ємець, Т.Б. Желтоножська, О.С. Зайченко, Т.О. Зінченко, М.І. Карковська, О.А. Кизима, Д.О. Климчук, О.Ю. Ключівська, Л.І. Кобилінська, Т.Є. Константінова, Л.Р. Куницька, О.О. Ліцис, О.В. Лобачевська, С.М. Лукін, В.І. Максін, О.П. Матшневська, Д.О. Міщенко, О.Г. Міщенко, Н.Є. Мітіна, О.С. М'якота, К.О. Палшова, Р.Р. Панчук, Н.М. Пермякова, Д.М. Петухов, С.В. Прилуцька, А.О. Рябцева, В.Ф. Сагач, А.І. Сепенко, Ю.В. Сеньків, Р.Я. Серкіз, Н.Р. Скорохід, О.В. Смуток, Н.Є. Стасюк, О.Б. Столяр, А.М. Томін, Г.І. Фальфушинська, Є.З. Філяк, Н.С. Фінок, Я. Хім'як, А.С. Чапля, В.В. Черепанов, В.В. Чумак, Л.М. Шаповал, О.П. Явороський, О.М. Якубчак, W. Berger, P. Heffeter, U. Ritter, P. Scharff

У монографії стисло викладено найвагоміші результати досліджень і розробок, отримані біологами у тісній співпраці з хіміками й фізиками у галузі наноматеріалів для біології, медицини, нанобіотехнологій. У шести логістично взаємопов'язаних тематичних розділах висвітлено питання молекулярного дизайну, синтезу багатофункціональних наноматеріалів для біології і медицини, доставки ліків у клітини-мішені за допомогою синтетичних наноматеріалів, використання полімерних олігоелектролітичних наноматеріалів для доставки нуклеїнових кислот у клітини різного походження, описано багатофункціональні наноматеріали для діагностичних цілей і біомедичного іміджингу, проблеми біосумісності й екоотоксичності наноконструктивних матеріалів, наведено приклади застосування наноматеріалів для лікувальних цілей.

Для студентів та аспірантів, які цікавляться наноматеріалами різного біомедичного призначення, а також досвідчених спеціалістів у цій галузі сучасної науки.

Рецензенти:

академік НАН України, доктор біологічних наук, професор С.О. Костерін,
академік НАН України, доктор фізико-математичних наук, професор Л.А. Булавін,
академік НАН України, доктор хімічних наук, професор М.Т. Картель

Рекомендовано до друку вченою радою
Інституту біології клітини НАН України (протокол № 8 від 25 вересня 2015 р.)

Видання здійснено за кошти Цільової комплексної програми
«Створення та розвиток науково-видавничого комплексу
НАН України»

Науково-видавничий відділ медико-біологічної, хімічної та геологічної літератури

Редактор Н.А. Серебрякова

© Р.С. Стойка, Ю.І. Прилуцький, А.Г. Наумовсь, Р.О. Білий, Я.Б. Блом, Н.М. Бойко, А.П. Бурлака, Ю.В. Вац, Т.Я. Вітак, А. Волошиновський, Г.З. Гайда, О. Гевусь, Л.Л. Гнатишина, О.І. Годована, О.В. Годованій, М.В. Гончар, І.І. Гринюк, Є.А. Гудзь, Н.М. Гула, О.В. Дмитренко, Л.Б. Дробот, М.П. Євстігнєєв, А.І. Ємець, Т.Б. Желтоножська, О.С. Зайченко, Т.О. Зінченко, М.І. Карковська, О.А. Кизима, Д.О. Климчук, О.Ю. Ключівська, Л.І. Кобилінська, Т.Є. Константінова, Л.Р. Куницька, О.О. Ліцис, О.В. Лобачевська, С.М. Лукін, В.І. Максін, О.П. Матшневська, Д.О. Міщенко, О.Г. Міщенко, Н.Є. Мітіна, О.С. М'якота, К.О. Палшова, Р.Р. Панчук, Н.М. Пермякова, Д.М. Петухов, С.В. Прилуцька, А.О. Рябцева, В.Ф. Сагач, А.І. Сепенко, Ю.В. Сеньків, Р.Я. Серкіз, Н.Р. Скорохід, О.В. Смуток, Н.Є. Стасюк, О.Б. Столяр, А.М. Томін, Г.І. Фальфушинська, Є.З. Філяк, Н.С. Фінок, Я. Хім'як, А.С. Чапля, В.В. Черепанов, В.В. Чумак, Л.М. Шаповал, О.П. Явороський, О.М. Якубчак, W. Berger, P. Heffeter, U. Ritter, P. Scharff, 2017

ISBN 978-966-00-1564-7

© НВП «Видавництво "Наукова думка" НАН України», дизайн, 2017

Потр
лів і на
промисл
дарстві т
таких ма
тим, що
галузях
статтях я
Пери
лекулярн
хів синте
стосуван
та метод
різняти і
спеціаль
зу в галу
дини і н
(engineer
їх вимірі
матеріалі
ли додат
якісно, а
із більш
здатні до
нізмі чи
більшість
Інши
морфоло
ними на
чи глобул
волокни
чи у фор
жуть ув
Що с
часто да
окремих
нальні на

Ми пропонуємо застосовувати для доставки ліків полімерний носій медипіні [6].

нак, мають низку недоліків, що заважають їх масовому використанню у основі вуглецю, золота, оксидів силіцію, заліза та інших речовин, які, од- ків. Запропоновано застосовувати ліпосоми, а також наноматеріали на ной, біосумісній і біодegradабельній платформі для адресної доставки лі- дали масштабнішим стає використання наночастинок як високоєфектив- тин-мішеней, тоді як традиційним формам ліків ці риси невластиві. Де- корисні властивості, як адресна доставка препарату до патологічних клі- ристання дає змогу істотно знизити негативні побічні ефекти хімотерапії у пацієнтів [1]. Батато ефективних систем доставки ліків також має такі дією і більшою біологічною доступністю в організмі. Крім того, їх вико- пини. Як правило, такі "поліпшені" ліки характеризуються тривалішою клітин-мішеней є актуальними завданнями сучасної фармакології і меди-

Імобілізація ліків на спеціальних носіях та їх адресна доставка до ристання дає змогу істотно знизити негативні побічні ефекти хімотерапії у пацієнтів [1]. Батато ефективних систем доставки ліків також має такі дією і більшою біологічною доступністю в організмі. Крім того, їх вико- пини. Як правило, такі "поліпшені" ліки характеризуються тривалішою клітин-мішеней є актуальними завданнями сучасної фармакології і меди-

2.2. Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носії, біофункціоналізованому N-стероїдгетаноламіном

Отже, отримані результати підтвердили, що доставка доксорубіцину в числі протипухлинних ліків.

на яких надає клітинним резистентності до різних ксенобіотиків, у тому рубіцин недоступним для мембранних транспортерів ABC, функціонуван- тична мембрана клітини. Очевидно, описана інкапсуляція робить доксо- матає доксорубіцину ефективною логати таку біологічну заваду, як плазма- Отже, полімерний компонент цього комплексу, що містить PEG, допо- цину з полімерним носієм пухлинними клітинами лінії MCF-7 (рис. 2.4).

істотно не впливають на інтенсивність поглинання комплексу доксорубі- цино з результатами експерименту, ані коліцини, ані цитохалазин B доксорубіцину, який лише через 1 год починає накопичуватися в ядрі.

носії, майже весь препарат виявляється в ядрі, на відміну від вільного док-

2.2. Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носії ...

зачати двом флуоресцен- тину в кліти- ним на носії сивно нако- нM, а док- накопичува- ці тут незна- на полімер- ліків ліній Отже, вико- забезпечує ми пов'яз- рани, таких цн. [15-17]. тох проти- тич є антра- кі флуорес- отей на ле- їх згатність і дії істотно бітків [17]. к карцином ладніркової шення, що на позаклі- зростання язаматичної ны [18]. ено швид- сорубіцину паку груд- дії на них та його им носем нцентрація 2 мкM). за допо- мікрокопа нкубації із (рис. 2.3. в 10 хв ін- тирмерному

в організмі. На продовження цієї роботи ми спробували додатково функціоналізувати нанокмпозитні комплекси доксорубідину лігандами з протизанальною й антиоксидантною активністю, щоб ще більше знизити токсичну дію доксорубідину на клітини нормальних тканин організму.

N-Ацилетаноламіни (NAE) — біологічно активні ліпіди, які належать до групи ендоканабіноїдів і продукуються не лише нейронами, а й практично усіма іншими типами клітин у відповідь на дію як фізіологічних, так і патологічних чинників. У попередніх дослідженнях ми виявили помітний нейропротекторний ефект NAE *in vivo* за хронічної залежності від морфіну, а також кардіопротекторну дію NAE за експериментальної ішемії серця у лабораторних тварин [21]. Показано також, що N-стеароїлетаноламін (NSE — один із представників NAE) гальмує ріст карциноми Льюїса у мишей і зменшує масштаби метастатичного ураження легені у тварин-пухлинноносіїв [22]. NAE також виявляють цитостатичний ефект *in vitro* щодо ліній злоякісних клітин [23]. У зв'язку з цим ми маємо підстави вважати, що NAE можуть бути корисними для функціоналізації нанокмпозитів, які застосовують для доставки доксорубідину, з метою надання цим матеріалам більшої біосумісності в організмі.

Ми дослідили вплив комплексу доксорубідину із NSE-полімерним носієм на продукування двох активних форм кисню (пероксиду водню і супероксидних аніон-радикалів) і на функціональний стан мітохондрій злоякісних клітин людини. Слід підкреслити, що серед клітин-мішеней були також клітини, резистентні до відомих хімотерапевтичних чинників унаслідок надекспресії в них мембранних транспортерів ліків — P-глікопротеїну і білка MRP-1. Здатність NSE пригнічувати загальну токсичність доксорубідину, іммобілізованого на полімерному носії, також продемонстровано на експериментальних тваринах (мишах).

Синтез нанорозмірних полімерних носіїв та іммобілізація на них N-стеароїлетаноламіну і доксорубідину

NSE і доксорубідин іммобілізували на поверхнево-активних функціональних нанорозмірних полімерних носіях, синтезованих на кафедрі органічної хімії Національного університету "Львівська політехніка" під керівництвом д-ра хім. наук О.С. Заїченка. За допомогою контрольованої полімеризації ненасиченого пероксиду і функціональних винільних мономерів синтезовано олігопероксида заданої функціональності та молекулярно-масового розподілу, а також бажаної розчинності й поверхневої активності (N-вінілпіролідон-5-(*трет*-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-гліцидилметакрилат). На рис. 2.5 наведено структуру носія N-ВП-ВЕМ-ГМА і схему способу приєднання до нього NSE.

Важливою структурною особливістю синтезованих полімерних носіїв є поєднання в їхніх молекулах двох реакційних центрів, а саме пероксидовмісних груп, здатних утворювати вільні радикали, та епоксидовмісних груп, які забезпечують взаємодію зі спиртами, амінами та іншими сполуками з

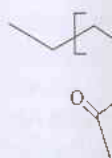


Рис. 2.5. Структура носія

рухливі мобілізу групу д цин ім тим но органіч

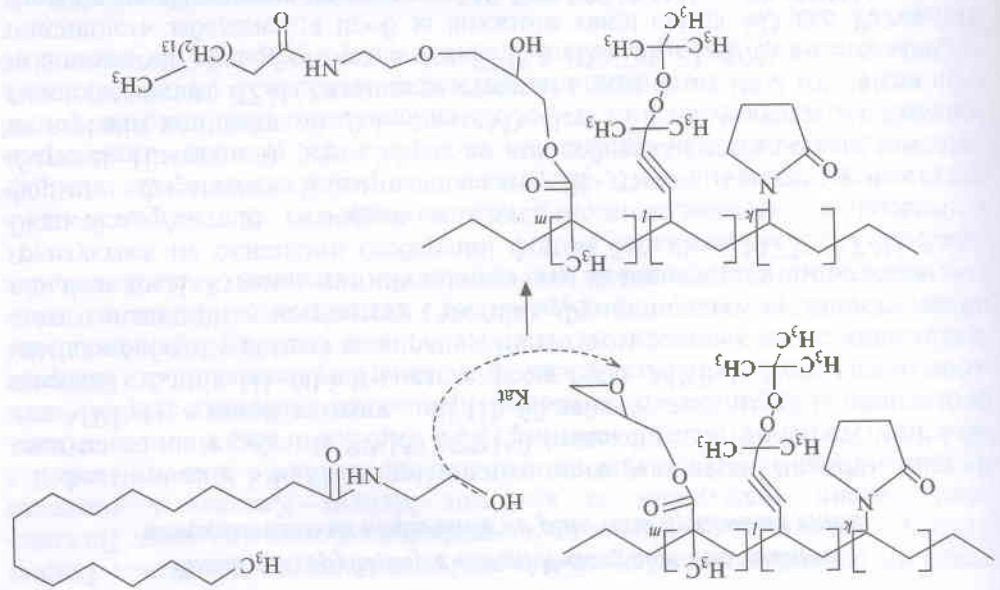
Вмі хлороф слідує із барв із преп проточі суперо Sigma, вані чи мкМ, 3 відразу флуорид

Вміст пероксиду водню в клітинах визначали за допомогою дитідродилхлорофлуоресцентилатерату (DCFDA, Sigma, США) перед додаванням до-спіжуваних чинників преенкубацією клітин ліній Jurkat T-лейкозу людини із барвником DCFDA (10 мкМ, 30 хв). Після завершення інкубації клітини із препаратами вмісту виірорували флуоресценцію зразків на каналі FL1 проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becon Dickinson, США). Вміст супероксидних аніонів (O₂⁻) визначали за допомогою дитідродилу (DHE, Sigma, США) в таких клітинах, до яких спочатку додавали досліджу-вані чинники і за 30 хв до завершення інкубації з ними — барвник (10 мкМ, 30 хв). Після інкубації з цим барвником клітини переносяли на лід і виірорували флуоресценцію зразків на каналі FL2 проточного цито-флуориметра.

Визначення вмісту активних форм кисню у тестованих клітинах

рухливим атомом водню. NSE на полімерному носії N-ВІІ-ВЕМ-ІМА ім-мобілізували ковалентним приєднанням проро літіду через гідроксильну групу до епоксидних груп у молекулі полімеру (див. рис. 2.5). Доксорубі-цин іммобілізували солубілізацією проро лікарського препарату синтезова-ним носієм із переведенням доксорубіцину з органічного середовища в не-органічне.

Рис. 2.5. Схема приєднання NSE через гідроксильну групу до епоксидних груп полімерно-го носія N-ВІІ-ВЕМ-ІМА (Кат — каталізатор етерат трифториду бору BF₃ · O(C₂H₅)₂)



2.2. Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носії ...

Вплив доксорубіцину в складі *N*-стеароїлетаноламінних нанокмпозитних комплексів на різні типи пухлинних клітин

Клітини лінії SW1573 недрібноклітинного раку легені людини, їх резистентна до ліків сублінія SW1573/2R160 (надекспресія глікопротеїну Р і білка MRP-1), а також клітини лінії HL-60 лейкозу людини та їх резистентна до ліків сублінія HL-60/adr (надекспресія білка MRP-1) були надані авторам для роботи у рамках співпраці з Інститутом ракових досліджень Віденського медичного університету (Австрія). Функціональну активність клітин під дією досліджуваних чинників визначали калориметричним методом, що ґрунтується на окисненні безбарвної форми барвника MTT (EZ4U Assay, Biomedica, Австрія) ензимами мітохондрій живих клітин до кольорової форми — формазану. Клітини висівали у 96-лункові пластикові планшети (Sarstedt, Німеччина), через 24 год до них добавляли досліджувані препарати в різній концентрації (0,1–10 мкМ). Через 72 год у лунки з клітинами вносили реагент EZ4U, планшети ставили у термостат на 2 год, після чого за допомогою мікрофотометра для ELISA (BioTek ELx800) вимірювали інтенсивність забарвлення проб за довжини хвилі світла 405 нм. Результати дослідів аналізували за програмою MS Excel 2010 (Microsoft, США).

Оцінювання функціонального статусу мітохондрій злоякісних клітин

Мембранний потенціал ($\Delta\Psi_m$) мітохондрій визначали за допомогою проточної цитометрії з використанням барвника JC-1 (5,5'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензімідазолілкарбоціанінйодид) (Sigma-Aldrich, США). За активного функціонування мітохондрій цей барвник утворює агрегати червоного кольору, які локалізуються в органелах, тоді як після істотного зниження мембранного потенціалу мітохондрій він перебуває у мономерній формі. Клітини лінії Jurkat Т-лейкозу людини піддавали дії досліджуваних чинників протягом 1, 3, 6, 12, 24 год, після цього промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) та інкубували за 37 °С протягом 10 хв у безсироватковому середовищі, що містило JC-1 (10 мг/мл). Надлишок барвника видаляли промиванням клітин забуференим фізіологічним розчином, інтенсивність їх флуоресценції негайно вимірювали на першому (FL1) і другому (FL2) каналах проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Морфологічний стан експериментальних тварин (миші) та їх виживаність за дії доксорубіцин-NSE-нанокмпозитів

Мишей-самців лінії Balb/c поділили на 4 групи по 6 тварин у кожній: 1) контрольна; 2) вводили доксорубіцин; 3) доксорубіцин + носій; 4) доксорубіцин + носій-NSE. Тваринам дослідних груп вводили досліджувані сполуки в кумулятивній дозі 20 мг/кг доксорубіцину в п'яти ін'єкціях (одноразова доза 4 мг/кг) через день. Контрольній групі тварин вводили фізіо-

логічний
щоденно
ність те
GraphPa
Біоетик
родних
викорис
Conventi
Other Se
них при
конгрес

Досл
дено сер
вань в о
ньоквад
Phenom
США).
(Microso

Енд
зокрема
спектив
линних
ферацій
S-фази
p21^{Waf1/Cip}
протеїн
цикліну

У п
40 мкМ
карцино
лом енд
змі та в
рубіцин

Наб
препара
практи
ність кі
ність до
онкохв
надексп
що нал
Р. гліко

Набуття злужкисними клітинами резистентності до протипухлинних препаратів є дуже актуальною проблемою і часто тралляється в клінічній практиці. У багатьох випадках саме цей феномен визначає низьку ефективність хімотерапії, що може зарожувати життя онкохворих. Резистентність до протипухлинних препаратів погу розвивається у 30—50 % онкохворих, підлядних хімотерапії [28]. Основною причиною цього явища є надекспресія в злужкисних клітин специфічних мембранних транспортів, що наліжають до родини АТФ-з'язувальних білків (білки ABC). Це зокрема Р. глікопротеїн, білок MRP-1 і білок Bcrp, високий вміст яких у пухлинних

Дія доксорубіцину в складі NSE-наокомпозиційних комплексів на пухлинні клітини, резистентні до ліків

У попередніх дослідженнях ми довели, що NSE за концентрації 30—40 мкМ виявляє антинезопластичну активність in vitro, а також інгібує ріст карциноми Льюїса метелі миші [27]. У зв'язку з протипухлинним потенціалом ендокананабінолідів постає питання про їх загальну токсичність в організмі та вплив на дію відомих протипухлинних препаратів, наприклад доксорубіцину.

Ендокананабіноліди (NSE, NAE) мають широкий спектр біологічної дії, зокрема чинять кардіо- і нейрорепротекторний вплив, що відкриває нові перспективи їх застосування в медицині [24]. Деякі NAE інгібують ріст пухлинних клітин різного генезу [25]. Зокрема, анандамід пригнічує проліферацію клітин раку грудної залози людини через блокування їх виходу з G₂ фази клітинного циклу. Основною причиною ефекту є індукція експресії білка p21^{Waf1/Cip1} (регулятор клітинного циклу) разом зі зниженням активності протеїнкінази Cdk2, що призводить до пригнічення утворення комплексу цикліну E з протеїнкіназою Cdk2 [26].

Ендокананабіноліди (NSE, NAE) мають широкий спектр біологічної дії, зокрема чинять кардіо- і нейрорепротекторний вплив, що відкриває нові перспективи їх застосування в медицині [24]. Деякі NAE інгібують ріст пухлинних клітин різного генезу [25]. Зокрема, анандамід пригнічує проліферацію клітин раку грудної залози людини через блокування їх виходу з G₂ фази клітинного циклу. Основною причиною ефекту є індукція експресії білка p21^{Waf1/Cip1} (регулятор клітинного циклу) разом зі зниженням активності протеїнкінази Cdk2, що призводить до пригнічення утворення комплексу цикліну E з протеїнкіназою Cdk2 [26].

Дослідження повторювали тричі в кожному варіанті. На діаграмах наведено середні значення "M", розраховані за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів, із зазначенням середньоквадратичної похибки σ. У роботі використано комп'ютер на основі Phenom II X4 975 з операційною системою Windows 7 64-bit (Microsoft, США). Отримані дані оброблено статистично у програмі MS Excel 2010 (Microsoft, США).

2.2. Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носії ...

Дослідження повторювали тричі в кожному варіанті. На діаграмах наведено середні значення "M", розраховані за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів, із зазначенням середньоквадратичної похибки σ. У роботі використано комп'ютер на основі Phenom II X4 975 з операційною системою Windows 7 64-bit (Microsoft, США). Отримані дані оброблено статистично у програмі MS Excel 2010 (Microsoft, США).

клітинах людини є ознакою негативного прогнозу в пацієнтів [29]. Кожен із зазначених білків-транспортів діє специфічно до певного типу субстратів, у тому числі ліків. Так, Р-глікопротеїн відповідальний за резистентність до таких протипухлинних препаратів, як колхіцин, дексаметазон, доксорубіцин, вінбластин, етопозид, тоді як надекспресія білка MRP-1 призводить до резистентності клітин до відкритину й доксорубіцину [30, 31]. Білок Bcrp крім забезпечення стійкості до дії метотрексату і мітоксантрону також відповідає за резистентність злоякісних клітин до новітніх препаратів таргетної дії, таких як іматиніб, що робить його особливо важливим біомаркером у сучасній хіміотерапії раку [32]. Через це пошук ефективних засобів, здатних долати набуту резистентність клітин до ліків, є важливим завданням сучасної фармакології і медицини.

Одним із дієвих підходів для подолання набутої резистентності злоякісних клітин до відомих протипухлинних препаратів є іммобілізація останніх на нових нанорозмірних носіях різної природи, зокрема на полімерах, у ліпосомах, наночастинках на основі золота, вуглецю, оксиду силіцію та ін. [6]. Ми пропонуємо скористатись з цією метою новітніми нанорозмірними полімерними носіями на основі N-вінілпіролідон-5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-гліцидилметакрилатом [7].

У дослідженні використано унікальні лінії ракових клітин, резистентні до протипухлинних ліків. Встановлено, що функціоналізація полімерного но-

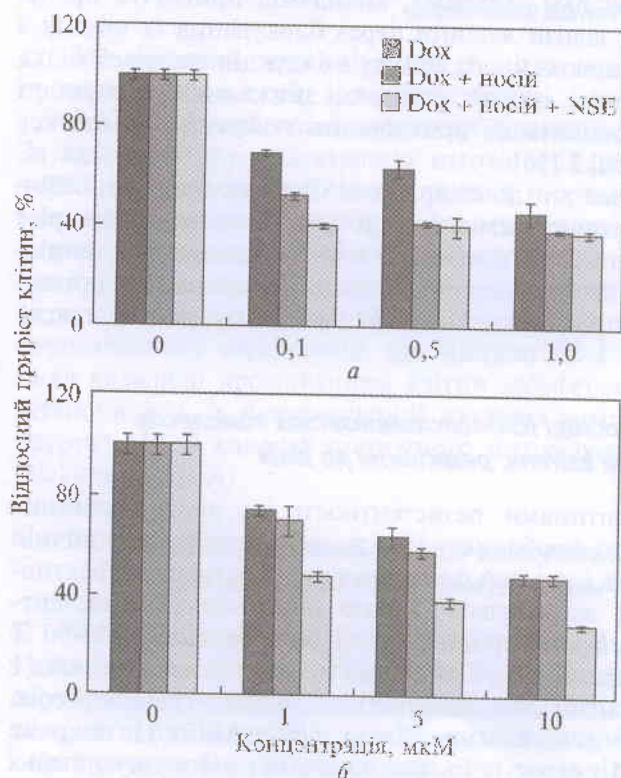


Рис. 2.6. Дія вільного доксорубіцину та іммобілізованого на полімерному наноносії й на такому ж носії, функціоналізованому NSE, на клітини лінії SW1573 недрібноклітинного раку легень людини (а) та сублінії SW1573/2R150, резистентної до ліків унаслідок надекспресії в них Р-глікопротеїну і білка MRP-1 (б)

Рис. 2.7. рубіцину на полі такому лізоване лінії П ни (а) HL-60/а ків уна вих білк

сія за д му на до хімі білків- Доксор ніший людин ни хар Р- гліко цину ною у

Ва нанон кардин рис. 2.7. вішим резисте тера М го нан ліків. Д рував н носієм.

сія за допомогою NSE забезпечує здатність доксорубіцину, іммобілізованого на такому носі, ефективно діяти на рухливі клітини з резистентністю до хіміотерапевтичних чинників, обумовленою надкасперією мембранних білків-транспортерів, а саме Р. тлікопротеїну і білка MRP-1 (рис. 2.6, 2.7). Доксорубіцин у складі помірних носів, які містять NSE, дає токсичніший шодо клітин лінії SW1573/2R160 недрібноклітинного раку легень людини порівняно з дією вільного доксорубіцину. Відомо, що ці клітини характеризуються надкасперією мембранних білків-транспортерів — Р. тлікопротеїну і білка MRP-1. Волночас відмінність між дією доксорубіцину на носі із NSE і дією нативного доксорубіцину була менш вираженою у клітин лінії SW1573, чутливих до цього протипухлинного препарату. Важливо зазначити, що доксорубіцин, іммобілізований на полімерному носі, демонстрував вищу токсичну дію як до карциномних, так і лейкозних клітин, резистентних до хімотерапії (див. рис. 2.7). Зокрема доксорубіцин-NSE-вмісний наноконкомпозит був удевчі дієвим за нативний доксорубіцин у клітилах лінії HL-60 лейкозу людини, резистентних до цього антибіотика внаслідок надкасперії білка-транспортера MRP-1 (див. рис. 2.7). Це засвідчує універсальність механізмів дії про-то наноносія під час подолання ним резистентності пухлинних клітин до ліків. Доксорубіцин у комплексі з носієм, що не містить NSE, продемонстрував нижчу антинеопластичну активність, ніж доксорубіцин у комплексі з носієм, який містить NSE.

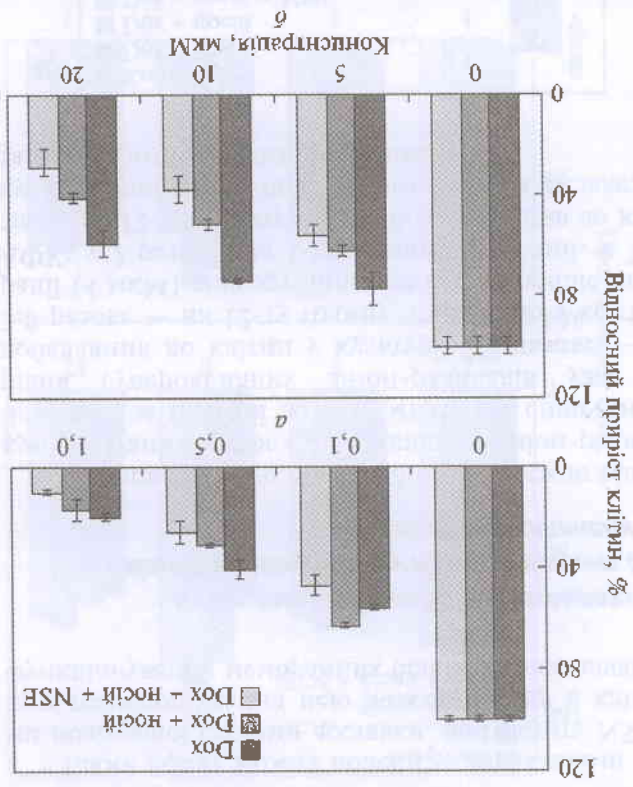


Рис. 2.7. Дія вільного доксорубіцину та іммобілізованого на полімерному носі й на такому ж носі, функціоналізованому NSE, на клітинні лінії HL-60 лейкозу людини (а) та клітини субліній HL-60/adr, резистентної до ліків унаслідок надкасперії в них білка MRP-1 (б)

2.2. Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носі ...

Такий ефект можна пояснити вираженими ліпофільними властивостями полімерної системи доставки, що містить NSE. Це полегшує і пришвидшує транспортування нею доксорубіцину в клітини-мішені незалежно від функціонування мембранних білків, які видаляють ліки з клітин-мішеней.

Вплив доксорубіцин-NSE-наноконструктивних комплексів і вільного доксорубіцину на продукування активних форм кисню пухлинними клітинами

Встановлено, що доксорубіцин, залежно від дози і тривалості дії індукує зростання рівня супероксидних аніон-радикалів у клітинах-мішенях. Зокрема, за низької дози (2 мкМ) він спричинює 1,8-разове підвищення рівня супероксидних аніон-радикалів уже на 3-тю годину після добавляння до клітин у культурі, 2,2-разове — на 6-ту годину інкубації, 3,8-разове — на 12-ту годину, порівняно з контролем. За вищої концентрації (4 мкМ) доксорубіцин ще інтенсивніше стимулює продукування цієї АФК: у 2 рази — на 1-шу годину інкубації, у 3 рази — на 6-ту й у 5 разів — на 12-ту годину після його додавання до клітин (рис. 2.8). На рисунку наведено результати одного з трьох незалежних дослідів із використанням проточної цитофлуориметрії.

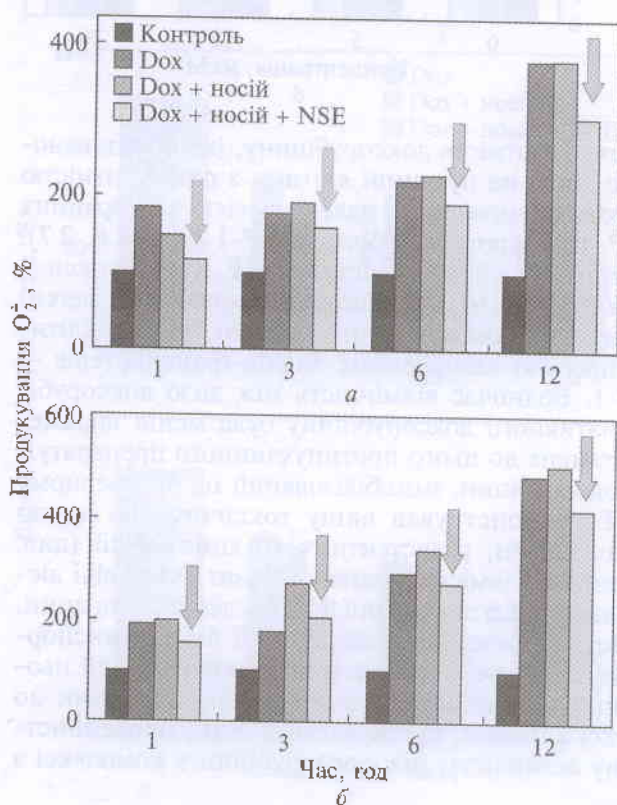


Рис. 2.8. Продукування супероксидних аніон-радикалів під впливом вільного доксорубіцину і доксорубіцин-NSE-наноконструктивного комплексу на клітині лінії Jurkat T-лейкозу людини в різні часові періоди за його концентрації 2 (а) і 4 мкМ (б)

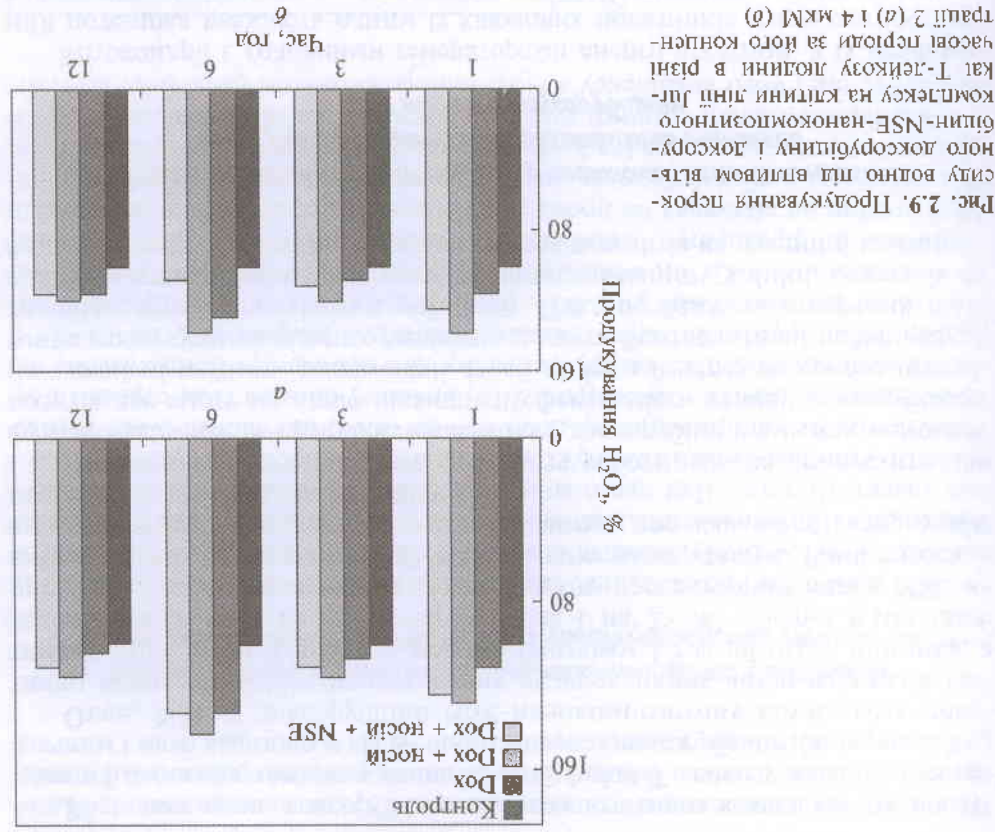
Рис. 2.8. Продукування супероксидних аніон-радикалів під впливом вільного доксорубіцину і доксорубіцин-NSE-наноконструктивного комплексу на клітині лінії Jurkat T-лейкозу людини в різні часові періоди за його концентрації 2 (а) і 4 мкМ (б)

Н. оксид. АФК. тривал. трьох. Зафік. сорубі. мкМ). О. мішен. органі. терату. дослід. ім. знижу. калів. стеріг. подаль. масшт.

масштабах (див. рис. 2.8).
 подавших часових точках такий ефект зберігався, хоча й у меншій мірі.
 стерілізації вже на 1-шу годину дії доксорубіцину в комплексі з носієм і в
 кашів порівняно з такою дією вільного доксорубіцину. Це зниження спо-
 знижує його здатність індукувати продуктування супероксидних аніон-ради-
 Імобілізація доксорубіцину на полімерному нанорозмірному носії
 досліджуванням протипухлинним антибіотиком [33].

тературними даними і вказує на мітохондріальний тип індукції апоптозу
 організму, але істотно не змінює продуктування H_2O_2 . Це узгоджується з лі-
 мішеннями, індуктує зростання рівня O_2^- , токсичних для нормальних клітин
 Отже, доксорубіцин вибірково діє на продуктування АФК клітинами-

мкМ), так і високої дози (4 мкМ) цього протипухлинного препарату.
 сорубіцину на клітини ліній Jurkat Т-лейкози, причому як за низької (2
 зафіксовано лише 1,3-разове зростання рівня H_2O_2 на 12-ту годину дії док-
 трох незалежних дослідів із використанням проточної пітофлуориметрії.
 привагою впливу (рис. 2.9). На рисунку наведено результати одного з
 АФК — пероксиду водню у клітинах-мішенях незалежно від його дози і
 оксидних аніон-радикалів, він практично не діє на продуктування інших
 На відміну від описаного впливу доксорубіцину на продуктування супер-



2.2. Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носії ...

Водночас вплив доксорубіцин-нанокompatитного комплексу на продукування пероксиду водню клітинами лінії Jurkat T-лейкозу людини був незначним і мало відрізнявся від впливу нативного доксорубіцину (див. рис. 2.9).

Отже, NSE у доксорубіцин-NSE-нанокompatитних комплексах практично повністю інгібує продукування супероксидних аніон-радикалів клітинами лінії Jurkat T-лейкозу людини протягом 1 год дії цього чинника, а також інгібує його на 50 % через 3 год і на 25 % — через 6 год (див. рис. 2.8). Наведені результати підтверджують протекторний вплив NSE на клітини щодо їх захисту від дії вільнорадикальних сполук. Вони узгоджуються з раніше продемонстрованими даними про кардіопротекторну дію цього біологічно активного ліпиду [23].

Підбиваючи підсумки цього фрагмента роботи, можна припустити, що функціоналізація N-стеароїлетаноламіном доксорубіциновмісних нанокompatитів дає змогу не лише підвищити ефективність впливу доксорубіцину на злоякісні клітини, резистентні до дії ліків, а й через вибіркоче пригнічення продукування вільних радикалів знизити його негативні побічні ефекти щодо нормальних клітин організму. Така особливість створених нами систем доставки ліків може мати важливе значення у клініці, оскільки забезпечить вищу селективність дії цих нанокompatитів на пухлинні клітини.

**Функціональний стан мітохондрій у злоякісних клітинах людини
за дії доксорубіцин-NSE-нанокompatитів порівняно
із дією вільного доксорубіцину**

Мітохондрії є головними генераторами енергії в клітині, а їх мембранний потенціал вважають одним із ключових показників життєздатності еукаріотичних клітин, зокрема клітин ссавців. Деполяризація мітохондрій за дії різних екстремальних чинників призводить до “витікання” цитохрому c з мітохондріального матриксу, активування ініціаторної про-каспази-9 у цитозолі та індукції апоптозу [34–36]. Здебільшого, цей процес зумовлений порушенням функціонування мітохондріального дихального ланцюга і надмірним продукуванням АФК (див. вище). Встановлено, що деполяризація мітохондрій внаслідок посиленого продукування АФК відбувається досить пізно — через 24 год дії доксорубіцину на клітини як за низької (0,5 мкМ), так високої (1 мкМ) його концентрації (рис. 2.10, див. вклейку). На рисунку наведено результати одного з трьох незалежних однотипних експериментів.

Імобілізація доксорубіцину на нанорозмірному носії не впливає на його здатність деполаризувати мітохондрії порівняно з такою дією вільного доксорубіцину, тоді як додаткова функціоналізація використаного полімерного носія за допомогою NSE зменшує кількість клітин із деполаризованими мітохондріями із 70 до 50 %. Оскільки мітохондрії деполаризуються внаслідок надмірного продукування АФК, отримані результати узгоджуються з наведеними вище даними (див. рис. 2.8) щодо здатності NSE інгібувати продукування однієї з дуже важливих АФК — супероксидних аніон-радикалів.

Отже, NSE пригнічує не тільки здатність доксорубіцину індукувати продукування клітинами АФК, а й інгібує деполаризацію мітохондрій клітини.

Це вказує на те, що нанокompatитний комплекс доксорубіцину на

Вплив на ток

Ще однією проявлятиметься в дослідженні цих тварин доксорубіцину у білізованій частині триває життя якої доксорубіцином день після са тіла тварин токсичної носії істотно тіла, загиблих нанокompatитів. Експеримент доксорубіцину.

Рис. 2.11. Пунктирні лінії вказують на вплив доксорубіцину і доксорубіцину на виживання тварин (б) мильні тварини вводили доклатний доз тіла) (X — з

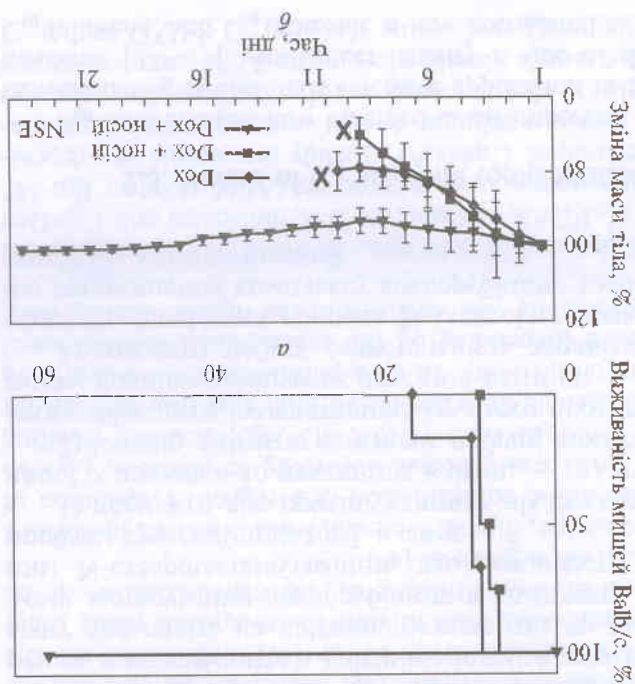


Рис. 2.11. Порівняння наслідків впливу віального докорубітину і докорубітин-НСЕ-біліну на виживаність (а) і масу тіла мишей лінії Balb/c, яким вводили докорубітин у летальній дозі (20 мг/кг маси тіла) (Х — загибель тварини)

Ще одне важливе завдання, яке ми поставили за мету — з'ясувати, чи проявлятиметься інгібування за допомогою NSE продукції АФК, виявлене в дослідках із культивуваннями клітинами (in vitro), також в експериментальних тваринах (in vivo). Для цього мишам лінії Balb/c вводили віальний докорубітин у летальній дозі (20 мг/кг маси тіла), а також докорубітин, імімітований на нанорозмірному носії або на носії, що містить NSE. Визначали тривалість життя тварин (рис. 2.11, а) і масу їхнього тіла, стримані значення якої вказувало на гостру токсичну дію препарату. Встановлено, що докорубітин у дозі 20 мг/кг викликає загибель тварин уже на 10—11-й день після введення (див. рис. 2.11, б). При цьому також зменшується маса тіла тварин (на 22%), оскільки, внаслідок гепатотоксичної і загально-токсичної дії препарату, імімітовану докорубітину на нанорозмірному носії істотно не впливало на прояв цих негативних ефектів (зниження маси тіла, загибель) у дії антибіотика, навпаки, тварини, яким вводили такі на-нокомпозит, гинули раніше (на 8—9-й день після введення) (див. рис. 2.11, б). Експериментальні тварини віражи масу тіла як за дії віального докорубітину, так і його комплексу з NSE-нанокомпозитом (див. рис. 2.11, б).

Вплив NSE у складі нанорозмірного комплексу з докорубітином на токсичну дію докорубітину в організмі експериментальних тварин

Це вказує на перспективність включення NSE до складу докорубітин-нанокомпозитів з метою зниження негативних побічних ефектів дії докорубітину на нормальні клітини організму.

2.2. Посилення ефективності дії докорубітину його імімітацією на полімерному носії ...

У зв'язку з цим можна припустити, що застосований нами полімерний носій позбавлений істотної власної біологічної активності, а лише посилює токсичну дію доксорубіцину, пришвидшуючи проникнення цього протипухлинного чинника крізь плазматичну мембрану клітин-мішеней. Отже, доставка доксорубіцину наноносієм, попередньо не функціоналізованим NSE, може бути шкідливим для хворих, оскільки за таких умов посилюється загальнотоксична дія цього лікарського препарату.

Встановлено, що функціоналізація наноносія доксорубіцину за допомогою NSE повністю усуває негативну дію (зниження маси тіла експериментальних тварин, їх смертність) летальної дози (20 мг/кг) доксорубіцину (див. рис. 2.11, б). Усі миші ($n = 6$), які отримали таку дозу доксорубіцину у складі NSE-вмісного наноконструкту, залишилися живими. При цьому в цих не виявлено помітних морфологічних відхилень від норми, про що інтегрально також свідчить стабільний показник маси тіла тварин (див. рис. 2.11, б).

Отже, в результаті проведеної роботи встановлено, що найбільшим недоліком ефективного протипухлинного чинника доксорубіцину є його кардіотоксичність і низка інших проявів загальної токсичності в організмі. Це унеможливує використання зазначеного препарату в дозі, вишій за кумулятивну. Як наслідок, часто не вдається повністю знищити злоякісні клітини, що призводить до рецидивів пухлини і появи ракових клітин, стійких до хіміотерапії. Ми довели, що функціоналізація нових нанорозмірних полімерних носіїв *N*-стеароїлетаноламіном інгібує індукване доксорубіцином продукування високотоксичних супероксидних аніон-радикалів. Ця активна форма кисню не відіграє важливої ролі в протипухлинній активності доксорубіцину, однак вона надзвичайно шкідлива для нормальних тканин і органів, передусім для серця й печінки. NSE пришвидшує проникнення доксорубіцину в клітини-мішені й тим самим посилює його біологічну дію навіть на клітини, резистентні до цього лікарського препарату. Тому застосування доксорубіцину в комплексі з носієм, функціоналізованим *N*-стеароїлетаноламіном, дає можливість вирішити низку важливих проблем сучасної онкології, а саме:

1) посилити дію протипухлинних лікарських препаратів унаслідок точнішої їх доставки до пухлинних клітин;

2) істотно знизити негативні побічні ефекти доксорубіцину, що дасть змогу збільшити кумулятивну дозу цього протипухлинного препарату і тим самим повніше знищувати пухлинні клітини;

3) подолати набуту резистентність злоякісних клітин до хіміотерапії, оскільки ліпофільна природа *N*-стеароїлетаноламіну сприяє пришвидшенню проникнення комплексу доксорубіцину з наноносієм крізь плазматичну мембрану клітин-мішеней.

2.3. Nature of C_{60} fullerene complexation with doxorubicin

C_{60} fullerene has now emerged as an important component of contemporary nanotechnologies and finds extensive application in nanobiotechnology and nanomedicine [37–39]. Anticancer activity is one of the most useful properties of C_{60} fullerene, and C_{60} molecule is now considered as a potential candidate of drug

for antitumor activity. Fullerene itself is a very reactive and pristine C_{60} fullerene is highly metastasis inhibitory towards various types of tumor cells. The maximum tumor growth is inhibited by the administered total dose of the spectrophotochemical therapy directly into the tumor. Fullerene also has other supporting properties.

Possible applications of C_{60} fullerene in the field of drug delivery and diagnosis, as well as in the treatment of cancer, are discussed. Dox via nanocarriers is a promising property of fullerene. Fullerene is a popular novel material, including its covalent C_{60} fullerene mechanism of action may rationalize the development of medico-biological applications.

Preparation of functionalized C_{60} fullerene. Fullerene was prepared by the arc discharge technology. The functionalized or heavy water fullerene morphology was studied.

Dox (Doxorubicin) was dissolved in water (or D₂O) and the C_{60} + Dox complex and Dox were prepared. The C_{60} + Dox complex was prepared by 12 h magnetic stirring of Dox was studied and the concentration dependence of the complexation was studied.

AFM characterization of C_{60} fullerene complexes with Dox. The AFM characterization of the C_{60} + Dox complex was studied by precise measurement of the evaporation rate of the complex carried out in the