

УДК 577. 112.7:616

# ВЗАЄМОДІЯ НАНОРОЗМІРНИХ КОН'ЮГАТІВ ДОКСОРУБІЦИНУ З ПРОТЕЇНАМИ І КЛІТИНАМИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Ю. Я. Кім<sup>1</sup>Р. О. Білий<sup>1</sup>Т. В. Скорохода<sup>2</sup>Н. М. Бойко<sup>1</sup>Н. С. Корній<sup>1</sup>Н. Є. Міміна<sup>2</sup>О. С. Заїченко<sup>2</sup>Р. С. Стойка<sup>1</sup><sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів<sup>2</sup>Національний університет «Львівська політехніка»

E-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

Отримано 09.02.2012

З метою підвищення терапевтичної ефективності раніше лікарський препарат доксорубіцин кон'югували з поверхнево-активним водорозчинним синтетичним олігомером ТФЗ, в результаті чого було отримано нанорозмірні водорозчинні кон'югати доксорубіцину з полімером ТФЗ-Докс, які мали високу цитотоксичну активність щодо пухлинних клітин *in vitro*. Оскільки використання протипухлинних препаратів відбувається шляхом внутрішньовенного введення, метою роботи було встановити особливості взаємодії ТФЗ-Докс із протеїнами та клітинами крові людини. Периферичну кров інкубували з кон'югатом ТФЗ-Докс або чистим препаратом доксорубіцину (контроль), після чого плазму і клітинну фракцію одержували центрифугуванням. Спорідненість кон'югованого і чистого доксорубіцину до клітин крові визначали за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Протеїни крові розділяли електрофорезом в 1% -й агарозі, після чого комплекси доксорубіцину з протеїнами виявляли за опромінення ультрафіолетовим світлом. Встановлено, що ТФЗ-Докс, на відміну від самого доксорубіцину, здатен вибірково акумулюватися нуклеарними клітинами крові, а також утворювати стійкі комплекси з альбуміном сироватки. Утворення таких комплексів може сприяти їх швидкому ендоцитозу лейкоцитами крові людини. Отримані дані свідчать про перспективність використання синтетичного олігомеру ТФЗ як носія для цільового доставлення доксорубіцину за умов лікування гематоонкологічних захворювань.

**Ключові слова:** клітини крові людини, сироватка крові, нанорозмірні кон'югати доксорубіцину, цільове доставлення доксорубіцину.

На сьогодні відома велика кількість лікарських засобів із високою протипухлинною активністю. Проте можливість доклінічного дослідження та впровадження в медичну практику таких препаратів стримується їх поганою розчинністю у воді, високою токсичністю, неможливістю подолати природні біологічні бар'єри та резистентністю бактерій і клітин, якої вони набувають під час гемотерапії. Природні, синтетичні або напівсинтетичні водорозчинні полімери є найпоширенішими носіями у водних системах керованого доставлення та вивільнення ліків у клітини-мішені [1, 2]. До них висувують особливі вимоги щодо розчинності, поверхневої активності й токсичності. Однак серед промислово доступних і

дешевих синтетичних полімерів практично відсутні сполуки, які відповідають цим вимогам, що зумовлено їхньою композиційною і молекулярно-масовою неоднорідністю, неконтрольованими активністю й молекулярною масою. Серед полімерних носіїв особливий інтерес становлять, зокрема, водорозчинні олігоелектроліти розгалуженої і блокової структур [3–5]. Нещодавно було встановлено, що деякі з цих полімерів є ефективними носіями протипухлинних лікарських препаратів [6–8]. На основі синтезованих олігомерних носіїв, через їх взаємодію з лікарським препаратом у спільному розчиннику та подальшим ультразвуковим диспергуванням суміші у фізіологічному розчині, було отримано нанорозмірні водні

комплекси з протипухлинним препаратом доксорубіцином (Докс) [4]. Одержані в результаті біологічних досліджень дані свідчать про те, що синтезовані полімери — телехелеві олігомери у комплексі із фосфатидилфоліном є перспективними як носії протипухлинних препаратів [5].

Для прикладу, поверхнево-активний водорозчинний синтетичний олігомерний носій ТФЗ забезпечує протипухлинну дію антинеопластичного препарату доксорубіцину в концентрації 0,1 мкг/мл, аналогічна дії характерна для чистого доксорубіцину, але в концентрації 1 мкг/мл, тобто в 10 разів більшій [8]. Використання таких носіїв у хіміотерапії раку дасть змогу суттєво знизити токсичний ефект протипухлинних препаратів на організм пацієнтів, що є важливим у лікуванні дітей, осіб похилого віку або дуже ослаблених онкохворих. Ці результати базуються головним чином на дослідженнях, проведених на культурах клітин *in vitro*, а також на асцитних пухлинах, що перевиваються, у мишей *in vivo* за умов внутрішньочеревної ін'єкції досліджуваних препаратів. Оскільки терапевтичне використання протипухлинних препаратів відбувається шляхом внутрішньовенного введення, важливо встановити особливості взаємодії цих речовин із протеїнами та клітинами крові людини. Метою роботи було дослідити особливості взаємодії нанорозмірних кон'югатів доксорубіцину з полімерними олігоелектролітами з протеїнами плазми і клітинами крові людини.

### Матеріали і методи

У роботі використовували лікарський препарат доксорубіцину та поверхнево-активні водорозчинні телехелеві коолігомери вінілацетату з малеїновим ангідридом, які містять кінцевий  $\alpha$ -аралкілпероксидний фрагмент, кон'юговані із доксорубіцином (ТФЗ-Дох) відповідно до робіт [9, 10]. Імобілізацію доксорубіцину здійснювали поступовим додаванням суспензії фосфатидилхоліну та розчину доксорубіцину в 0,1% -му розчині NaCl до розчину олігомеру в 0,1% -му NaCl з подальшим обробленням ультразвуком протягом 20 с. Відсутність вільного доксорубіцину підтверджували за допомогою УФ-спектроскопії на приладі Spеcоrd-M40. Периферичну кров отримували із пальця здорових донорів [11]. Для запобігання коагуляції 200 мкл крові розводили у фізіологічному розчині (0,9% NaCl) у пропорції 1:3. Для дослідження до 50 мкл

крові додавали 5 мкл розчину доксорубіцину (10 мг/мл) або кон'югату ТФЗ-Докс (10 мг/мл) та інкубували впродовж 30 хв за 37 °С, періодично перемішуючи. Після закінчення інкубації клітини осаджували центрифугуванням при 2 000 г протягом 3 хв і відбирали супернатант, що містив протеїни плазми крові. Клітини промивали фізіологічним розчином (500 мкл) центрифугуванням при 2 000 г упродовж 5 хв і наносили на предметне скельце. Прижиттєву мікроскопію клітин проводили на мікроскопі Мікмед К-2-12 (ЛОМО, Російська Федерація) за відповідних довжин хвилі збудження та емісії для виявлення флуоресценції. Як контроль використовували препарати клітин за відсутності дії досліджуваних речовин. Для визначення форм знаходження кон'югату ТФЗ-Дох в плазмі крові застосовували фракцію протеїнів плазми, одержану центрифугуванням після інкубації крові з ТФЗ-Докс. Із супернатанта готували препарати для мікроскопії та аналізували їх під мікроскопом Мікмед К-2-12 за довжини хвилі флуоресценції доксорубіцину. Контролем слугував розчин кон'югату у фізіологічному розчині. Для дослідження взаємодії ТФЗ-Докс із протеїнами крові супернатант розділяли електрофорезом в 1% -й агарозі в трис-боратному буфері, рН 8,3. Після завершення електрофорезу гелі агарози фотографували в ультрафіолеті, фіксували в 10% -й оцтовій кислоті й фарбували розчином 0,1% -го барвника амідочорний 10 Б. Гелі відмивали 7% -ю оцтовою кислотою з наступним скануванням.

### Результати та обговорення

Корисною властивістю антибіотика доксорубіцину і його нанорозмірних кон'югатів є їхня здатність до флуоресценції за опромінення ультрафіолетом. Ця властивість дає змогу використовувати флуоресцентну мікроскопію для дослідження взаємодії цих речовин із клітинами крові людини. Порівняння результатів флуоресцентної і фазово-контрастної мікроскопії свідчить про те, що інкубація клітин крові з препаратом ТФЗ-Докс упродовж 30 хв сприяє інтенсивному включенню цієї сполуки до нуклеарних клітин крові (рис. 1). Характер взаємодії комплексу ТФЗ-Докс з лейкоцитами (зв'язування чи інтерналізація), а також ідентифікація цих клітин (лімфоцити, мегакаріоцити, моноцити/макрофаги і т. д.) потребує подальшого дослідження. Флуоресценція мембран дає підставу припустити певну спо-

рідненість ТФЗ-Докс до мембран еритроцитів. На відміну від ТФЗ-Докс, сам антибіотик доксорубіцин не виявляв особливої вибірковості щодо клітин крові. На основі отриманих даних можна зробити висновок про те, що комплексу ТФЗ-Докс притаманна вибірковість у взаємодії з клітинами крові. При цьому головними мішенями цієї сполуки є нуклеарні клітини. Аби з'ясувати механізм, за яким відбувається акумуляція кон'югату ТФЗ-Докс нуклеарними клітинами крові, слід встановити як форми цієї сполуки в плазмі крові, так і особливості її взає-

модії з протеїнами. У першому випадку нами було використано флуоресцентну мікроскопію, у другому — електрофорез в 1% -й агарозі за неденатурувальних умов [12]. Було встановлено (рис. 2), що в сироватці крові, як і у фізіологічному розчині, кон'югати ТФЗ-Докс містяться у вигляді міцел. Під час електрофоретичного розділення протеїнів сироватки крові після інкубації з ТФЗ-Докс було виявлено (рис. 3), що флуоресцентна мітка перебуває в зоні мажорного протеїну, який за своєю рухливістю в агарозному гелі є альбуміном. При

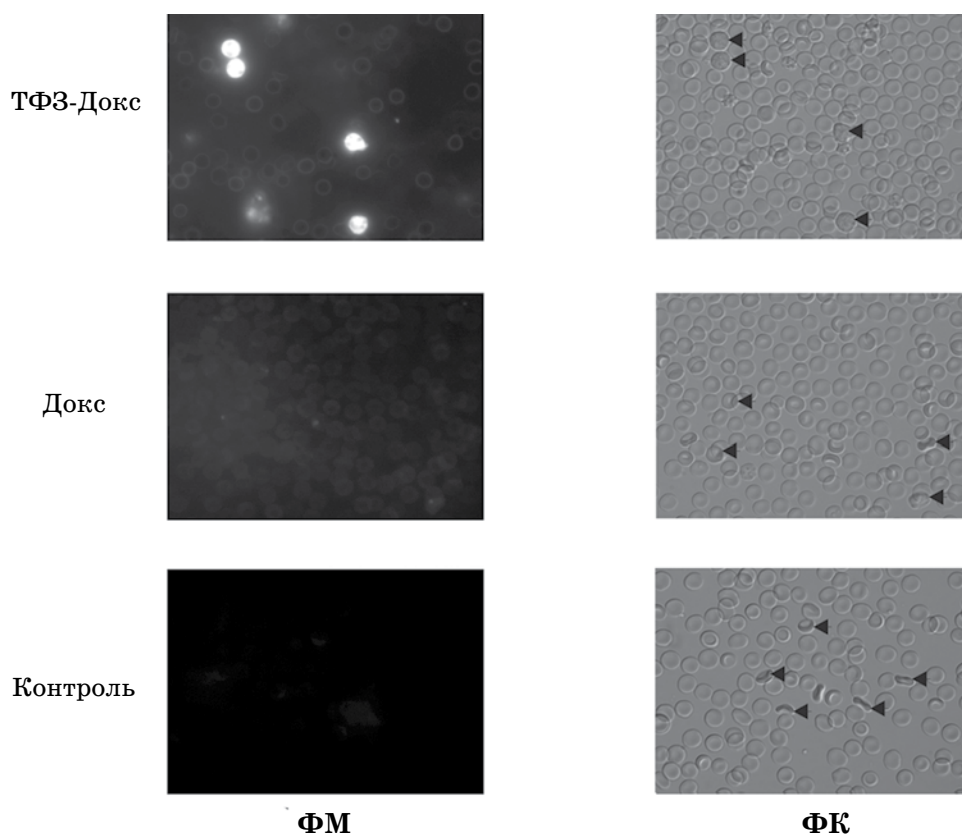


Рис. 1. Взаємодія доксорубіцину (Докс) і кон'югатів доксорубіцину з полімерним наноосієм (ТФЗ-Докс) із клітинами периферичної крові людини: ФМ — флуоресцентна мікроскопія; ФК — фазово-контрастна мікроскопія. Контроль — клітини за відсутності дії чинників. Стрілками показано положення ядерних клітин



Рис. 2. Форми кон'югатів доксорубіцину з полімерним наноосієм (ТФЗ-Докс) у фізіологічному розчині і сироватці крові людини. Флуоресцентна мікроскопія

цьому утворення флуоресцентно міченого альбуміну не було виявлено у разі, коли ефектором слугував чистий доксорубіцин. Отримані дані вказують на те, що нановозмірні кон'югати ТФЗ-Докс, на відміну від самого доксорубіцину, можуть утворювати стійкі комплекси з альбуміном сироватки крові людини.

Таким чином, у результаті проведених досліджень було встановлено, що поверхнево-активні водорозчинні олігомери з кінцевим  $\alpha$ -аралкілпероксидним фрагментом, кон'юговані з доксорубіцином і фосфатидилхоліном ТФЗ-Докс, здатні вибірково акумулюватися нуклеарними клітинами крові. Цей ефект може бути пов'язаний з тим, що кон'югати ТФЗ-Докс здатні утворювати стійкі комплекси з альбуміном. Утворення таких комплексів може сприяти їх швидкому ендоцитозу. Оскільки досліджувані кон'югати мають високу цитотоксичність стосовно лейкемічних клітин, отримані результати вказують на перспективність їх використання як протипухлинних препаратів при гематоонкологічних захворюваннях.

Роботу підтримано грантом УНТЦ, проект № 4953.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Yokoyama M. Polymeric Micelles for the Targeting of Hydrophobic Drugs // Polym. Drug Deliv. Syst. — 2005. — V. 148. — P. 533–576.
2. Torchilin V. P. Multifunctional nanocarriers // Adv. Drug Deliv. Rev. — 2006. — V. 58, N 14. — P. 1532–1555.
3. Alcantar N. A., Avdil E. S., Israelachvili T. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces // J. Biomed. Mat. Res. — 2000. — V. 51, N 3. — P. 343–351.
4. Рябцева А. А., Митина Н. Е., Бойко Н. Н. и др. Наноразмерные системы доставки антибактериальных и противоопухолевых препаратов на основе новых ПЭГ-содержащих олигомерных носителей // Пластмассы со специальными свойствами. Сб. науч. трудов / Под общ. ред. Лаврова Н. А. — СПб.: ЦОГ «Профессия». — 2011. — С. 121–122.
5. Krupak V. I., Lehka L. V., Chumak V. V. et al. Application of novel polymeric nanoscale carriers for increasing efficiency of anticancer drugs // Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 4 (додаток 2). — С. 266–267.
6. Boiko N., Filyak E., Panchuk R. et al. Biomedical application of functional nanophosphors for diagnostics and drug (gene) delivery

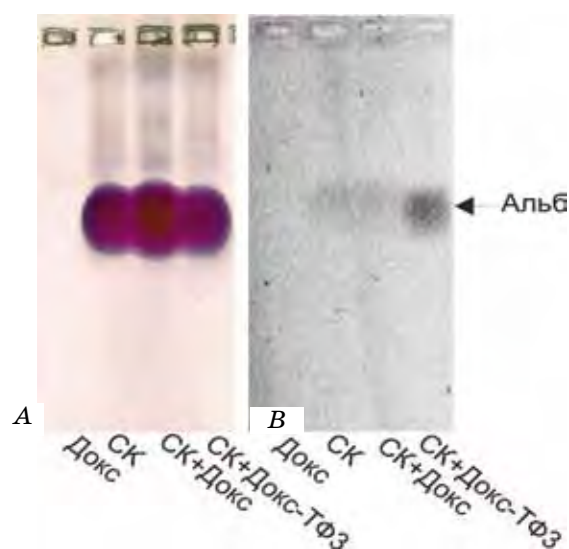


Рис. 3. Взаємодія доксорубіцину (Докс) і кон'югатів доксорубіцину з полімерним наноосієм (ТФЗ-Док) із протеїнами сироватки крові людини:

А — гель, зафарбований барвником амідочорний 10Б; В — гель, сфотографований в ультрафіолетовому випромінюванні

- systems // Abstracts of The Third International Workshop on Advanced Spectroscopy and Optical Materials (IWASOM'2011), Gdansk, Poland, 17–22 July 2011. — P. 128.
7. Zaichenko A., Mitina N., Boiko N. et al. Functional nanophosphors for diagnostics and drug (gene) delivery systems // Abstracts of The Second international conference «Nanobiophysics: fundamental and applied aspects» Kyiv, Ukraine, 6–9 October 2011. — P. 96.
8. Stoika R., Zaichenko A., Bilyy R. et al. Drug delivery by novel functionalized nanosized carriers // Ibid. — P. 110.
9. Скорохода Т. В., Лобаз В. Р., Заіченко О. С. // Вісн. Нац. ун-ту «Львівська політехніка». «Хімія, технологія речовин та їх застосування». — 2008. — № 609. — С. 352–355.
10. Ташмухамедов С. А., Акбаров Х. И., Тиллаев Р. С. Межмолекулярные взаимодействия в растворах привитых сополимеров // Усп. химии. — 1986. — Вып. 11. — С. 1920–1935.
11. Сергеева Н. А. Электрофорез в современном диагностическом процессе // Клини. лаб. диагн. — 1999. — № 2. — С. 25–32.
12. Титов В. Н., Амелюшкина В. А. Электрофорез белков сыворотки крови. — М.: Медицина, 1994. — 246 с.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ  
КОНЬЮГАТОВ ДОКСОРУБИЦИНА  
С ПРОТЕИНАМИ И КЛЕТКАМИ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

Ю. Я. Кит<sup>1</sup>  
Р. А. Бильй<sup>1</sup>  
Т. В. Скорохода<sup>2</sup>  
Н. Н. Бойко<sup>1</sup>  
Н. С. Корний<sup>1</sup>  
Н. Е. Митина<sup>2</sup>  
А. С. Заиченко<sup>2</sup>  
Р. С. Стойка<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины,  
Львов

<sup>2</sup>Национальный университет  
«Львовская политехника»

E-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

С целью увеличения терапевтической эффективности ранее лекарственный препарат доxorубин конъюгировали с поверхностно-активным водорастворимым синтетическим олигомером ТФ3, в результате чего были получены наноразмерные водорастворимые конъюгаты доxorубин с полимером ТФ3-Докс, которые обладали высокой цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам *in vitro*. Поскольку терапевтическое использование противоопухолевых препаратов осуществляется путем внутривенного введения, целью работы было установить особенности взаимодействия ТФ3-Докс с протеинами и клетками крови человека. Периферическую кровь инкубировали с конъюгатом ТФ3-Докс или чистым препаратом доxorубин (контроль), после чего плазму и клеточную фракции получали центрифугированием. Сродство конъюгированного и чистого доxorубин к клеткам крови определяли при помощи флуоресцентной микроскопии. Протеины крови разделяли электрофорезом в 1%-й агарозе, после чего комплексы доxorубин с протеинами определяли при облучении в ультрафиолете. Было показано, что ТФ3-Докс, в отличие от самого доxorубин, способен избирательно связываться с нуклеарными клетками крови, а также образовывать устойчивые комплексы с альбумином сыворотки. Образование таких комплексов может способствовать их быстрому эндоцитозу лейкоцитами крови человека. Полученные данные указывают на перспективность использования синтетического олигомера ТФ3 для направленной доставки доxorубин при лечении гематоонкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** клетки крови человека, сыворотка крови, наноразмерные конъюгаты доxorубин, взаимодействие.

**INTERACTION OF NANOSCALE  
DOXORUBICIN CONJUGATES  
WITH PROTEINS AND CELLS  
OF PERIPHERAL HUMAN BLOOD**

Y. Ya. Kit<sup>1</sup>  
R. O. Bilyy<sup>1</sup>  
T. V. Skorokhoda<sup>2</sup>  
N. M. Boiko<sup>1</sup>  
N. S. Korniy<sup>1</sup>  
N. E. Mitina<sup>2</sup>  
A. S. Zaichenko<sup>2</sup>  
R. S. Stoika<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Lviv

<sup>2</sup>Lviv Polytechnic National University

E-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

With the aim to enhance therapeutic effectiveness, a drug doxorubicin was previously conjugated with surface-active water-soluble synthetic oligomer TF3 and water-soluble TF3-Dox conjugates were obtained possessing high cytotoxic activity towards tumor cells *in vitro*. As the therapeutic use of anticancer drugs is performed by intravenous administration, the purpose of the work was to determine the peculiarities of TF3 Docks interaction with proteins and human blood cells.

Peripheral human blood was incubated with TF3-Dox or with pure doxorubicin, as control, afterwards blood was separated for plasma and cellular components by centrifugation. The affinity of doxorubicin and TF3-Dox to blood cells was evaluated by fluorescent microscopy. Plasma proteins were separated by electrophoresis in 1% agarose gel and detected via UV-light illumination. It was found that TF3-Dox unlike doxorubicin are able to be selectively accumulated in nucleated blood cells as well as to form stable complexes with serum albumin. Formation of such complexes can facilitate their endocytosis by nucleated blood cells. Obtained data suggest the perspectives of the use of TF3 carrier for targeted delivery of doxorubicin during onco-haematologic diseases.

**Key words:** human blood cells, sera proteins, nanoscale doxorubicin conjugates, interaction.