

Міцелярні композиції з доксорубіцином та їх цитотоксичність

Л.Р. Куницька¹, Т.Б. Желтоножська¹, Р.С. Стойка², Н.М. Бойко²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60. 01033 Київ, Україна

²Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, 79005 Львів, Україна

*Досліджено міцелярні композиції з доксорубіцином, де носіями токсичного протиракового препарату слугують міцели диблок- і триблок-кополімерів (ДБК і ТБК) з асиметричними хімічно комплементарними блоками (метокси)поліетиленоксиду та поліакриламідом (МОПЕО-*b*-ПАА і ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА), а також частково гідролізовані похідні триблок-кополімеру (ТБК-СООН). Показано, що вихідні блок-кополімери та продукти їх лужного гідролізу утворюють у воді специфічні міцели моно- та полімолекулярного типів з малими значеннями критичної концентрації міцелоутворення за рахунок інтрамолекулярної взаємодії хімічно комплементарних блоків. Встановлено, що міцелярні композиції ТБК і ТБК-СООН з протипухлинним препаратом доксорубіцином посилюють цитотоксичну дію препарату, що дає змогу у перспективі зменшити його загальну токсичність при застосуванні у хіміотерапії завдяки істотному зниженню терапевтичної дози.*

Ключові слова: поліетиленгліколь, поліакриламід, міцелярні композиції, протипухлинні препарати.

Вступ.

Створення і використання полімерних міцел для доставки погано розчинних і токсичних лікарських препаратів у живі організми набуло особливої актуальності останнім часом [1–4]. Такі міцелярні наноконтейнери, побудовані на основі біосумісних і біодеградабельних гетерополімерів, дають змогу істотно знизити терапевтичні дози лікарських субстанцій, захистити здорові органи і тканини організму від руйнівної дії токсичних препаратів при хіміотерапії, а також створити розчинні форми погано розчинних у воді лікарських речовин [5–7]. Крім того, за наявності певних лігандів міцелярні наноконтейнери здатні до адресної доставки ліків і тому можуть забезпечити контрольоване вивільнення їх у певних органах, тканинах і клітинах [8]. Отже, полімерні міцели по праву вважаються одними з найбільш зручних і перспективних носіїв для доставки погано розчинних і/або токсичних лікарських препаратів.

У клінічній практиці лікування онкологічних захворювань широко використовують доксорубіцин (Dox) завдяки його потужній дії на широкий спектр пухлинних клітин. Проте висока токсичність цього препарату обмежує його використання через тяжкі побічні ускладнення, перш за все, в роботі серцево-судинної системи [9–11]. Саме тому останнім часом з'явилося багато робіт, присвячених використанню різноманітних міцелярних носіїв для доставки цього препарату. Для створення полімерних міцелярних носіїв здебільшого

використовували класичні амфифільні блок-кополімери, побудовані з гідрофільних і гідрофобних блоків, що давало можливість їм самоорганізовуватись у водному середовищі. Сьогодні відомі такі носії на основі блоків поліетилен- і поліпропіленоксидів, поліамінокислот, полікапролактону, полілактидів тощо [12–14]. Зокрема, в патенті [15] описані композиції малорозчинних у воді лікарських препаратів, у тому числі Dox, з міцелями кополімерів N-вінілпіролідону, N-ізопропілакриламідом та естеру малеїнового ангідриду з поліетиленгліколем, які додатково зшиті N,N'-метилен-*bis*-акриламідом для стабілізації міцелярної структури. Відомі також міцелярні композиції Dox з диблок-кополімерами, отриманими на основі полівінілпіролідону і полі(D,L-лактиду) [16], поліетиленоксиду (ПЕО) та похідних поліаспарагінової кислоти [17], ПЕО та інших гідрофобних поліетерів, в яких Dox кон'югований з гідрофобним блоком. Такі композиції прискорювали доставку Dox до пухлин і запобігали його токсичним проявам щодо здорових тканин. Крім того, як носії багатьох фармацевтичних агентів, таких як антигени, антитіла, гормони, антидепресанти, наркотичні речовини, серцево-судинні, гіпотензивні та протипухлинні препарати, у тому числі Dox, добре відомі міцели амфифільних блок-кополімерів за участю метоксиполіетиленоксиду та поліортоестерів [18].

Метою цієї роботи була розробка нових міцелярних

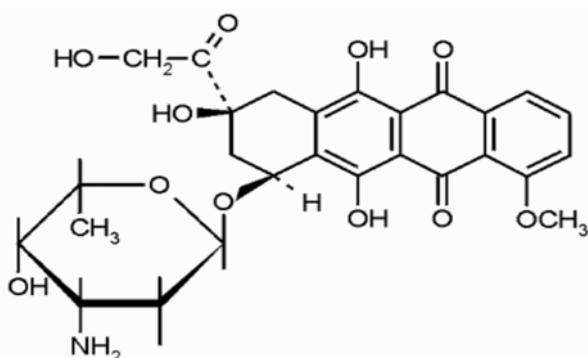


Рис. 1. Структурна формула молекули доксорубіцину

композицій з доксорубіцином, в яких носіями токсичного протиракового препарату виступали міцели особливого типу, утворені подвійними гідрофільними диблок- і триблок-кополімерами (ДБК і ТБК) з асиметричними хімічно комплементарними біосумісними (і одним біодеградабельним) блоками (метокси)поліетиленоксиду та поліакриламідом (МО-ПЕО-*b*-ПАА і ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА), а також частково гідролізованим похідним триблок-кополімеру (ТБК-СООН). Ці композиції виявляли стабільність у водному середовищі і посилювали протиракову дію Dox.

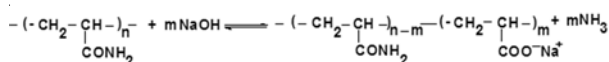
Експериментальна частина.

В роботі використовували зразок Dox (рис. 1) виробництва компанії «ВЕРОФАРМ ОАО» (Росія) у вигляді гідрохлориду.

Синтез асиметричних ДБК і ТБК з хімічно комплементарними блоками (МО)ПЕО і ПАА істотно різної довжини проводили як і в роботах [19, 20] методом радикальної матричної блок-кополімеризації з використанням окисно-відновного процесу утворення вільних радикалів на кінцевих гідроксильних групах (метокси)поліетиленгліколю. Для синтезу використовували зразки МОПЕГ і ПЕГ з $M_n = 5$ і 6 кДа фірм «Fluka» (Німеччина) і «Aldrich» (США) відповідно, та мономер акриламід (АА) виробництва фірми Reanal (Угорщина), який перекристалізували з хлороформу. Як ініціатор використовували діамонійгексанітратоцерат виробництва компанії «Aldrich» (США). Блок-кополімеризацію проводили за мольних співвідношень $[Ce^{IV}]/[OH] = 1 \div 1,04$ і $[Ce^{IV}]/[AA] = 1 \cdot 10^{-3}$ в інертній атмосфері за температури 20 °С при постійному перемішуванні протягом 24 год.

Для підтвердження хімічної будови синтезованих кополімерів і визначення середнього ступеня полімеризації блоків ПАА використовували 1H ЯМР-спектроскопію. Для цього готували розчини ДБК і ТБК у D_2O з концентрацією 10 кг·м⁻³. Спектри записували на ЯМР-спектрометрі Mercury-400 фірми «Varian» (США) за кімнатної температури і частоти 400 МГц за умов накопичення сигналів для підвищення співвідношення сигнал/шум. Відлік значень хімічних зсувів здійснювали відносно сигналу протонів тетраметилсилану.

З метою посилення взаємодії між мицелярним носієм і позитивно зарядженими молекулами гідрохлориду Dox частину акриламідних ланок блоків ПАА в макромолекулах ТБК переводили в акрилатні ланки шляхом реакції лужного гідролізу:



Реакцію проводили у водному розчині ТБК з концентрацією 10 кг·м⁻³ за наявності 5 М розчину NaOH за $T=50$ °С при постійному перемішуванні протягом 10 хв. У результаті, отримували частково гідролізований зразок ТБК-СООН у Na-формі, який переводили в Н-форму шляхом підкислення розчинів добавками HCl до pH~2. Наявність карбоксильних груп у складі модифікованого кополімеру підтверджували методом FTIR спектроскопії. Тонкі плівки водних розчинів кополімерів ($l=10-12$ мкм) готували шляхом відливання на флюоритових скельцях діаметром 30 мм, товщиною ~4 мм, які були прозорі в області $\nu > 1100$ см⁻¹. Плівки формували на повітрі, потім сушили протягом одного тижня у вакуум-ексикаторі над CaCl₂. Спектри знімали на FTIR спектрометрі «Nicolet NEXUS - 475» (США) за $T=20$ °С в діапазоні 1100–4000 см⁻¹. Отримані спектри у вигляді залежності величини пропускання (T) від хвильового числа (ν) переводили далі у спектри вигляду $D=f(\nu)$, за допомогою співвідношення $D = \lg(T_0/T)$, в якому T – значення пропускання в спектрі за деякого ν , T_0 – максимальне значення пропускання в розглянутій області спектра, D – оптична густина.

Кількість карбоксильних груп у складі модифікованого кополімеру визначали шляхом потенціометричного титрування. Використовували метод розрахунку величини поглинання гідроксил-іонів, детально описаний в роботі [21]. Потенціометричне титрування водних розчинів вихідних і модифікованих кополімерів з концентрацією $C=2$ кг·м⁻³ проводили в термостатованій комірці при перемішуванні розчину магнітною мішалкою в інертній атмосфері (аргон). Температуру підтримували в межах $25 \pm 0,1$ °С. Е.р.с. розчину вимірювали скляним і хлорсрібним електродами на pH-метрі I-160M (Білорусь). Значення е.р.с. переводили в одиниці pH аналітичним методом за коефіцієнтами калібрувальної прямої, яку було отримано за стандартними буферними розчинами і обраховано методом МНК. Точність визначення pH становила 0,02. Кожну наступну порцію титранту (0,2 н. NaOH) додавали через 2 хв. За аналогічних умов проводили титрування деіонізованої води («холостого розчину»). Величину поглинання гідроксил-іонів, (σ_{OH^-}), розраховували за даними титрування, використовуючи формулу:

$$\sigma_{OH^-} = \frac{C_0}{g} (1 - 10^{pH - pH_0}), \quad (1)$$

де: C_0 – концентрація лугу в розчині з урахуванням його розбавлення при титруванні (мг·екв·м⁻³); g – концентрація полімеру, г·м⁻³; pH – значення від'ємного

логарифма концентрації OH^- -іонів у розчині полімеру за певних значень C_0 ; pH_0 – відповідні значення pH у “холостому розчині” за тих же самих C_0 .

Міцелютворення ДБК, ТБК і ТБК-СООН у водному середовищі вивчали методами пружного світлорозсіювання (ПС) та проникної (трансмсійної) електронної мікроскопії (ТЕМ). Для визначення термодинамічних параметрів міцел вимірювали інтенсивність розсіювання вертикально поляризованого світла за допомогою модернізованого приладу ФПС-3 (Росія), що містив світлодіод WP7113VGC/A ($\lambda=520$ нм) від “Kingbright”, контролер ADC-CPU™ фірми “Insoftus” (Україна) і програму “WINRECORDER”. Експерименти проводили за кута розсіювання $\theta=90^\circ$. У дослідженнях морфології та розмірів міцел використовували електронний мікроскоп JEM-1230 фірми “JEOL” (Японія) за напруги 90 кВ. Для цього брали малі краплини ($1 \cdot 10^{-4}$ см³) міцелярних розчинів кополімерів ($C=0,2 \div 0,3$ кг·м⁻³), наносили на мідні сіточки, вкриті плівкою формвару та вуглецю, потім висушували за кімнатної температури протягом $\sim 0,5\text{--}1,0$ хв на повітрі і ще 1 добу у вакуум-ексикаторі.

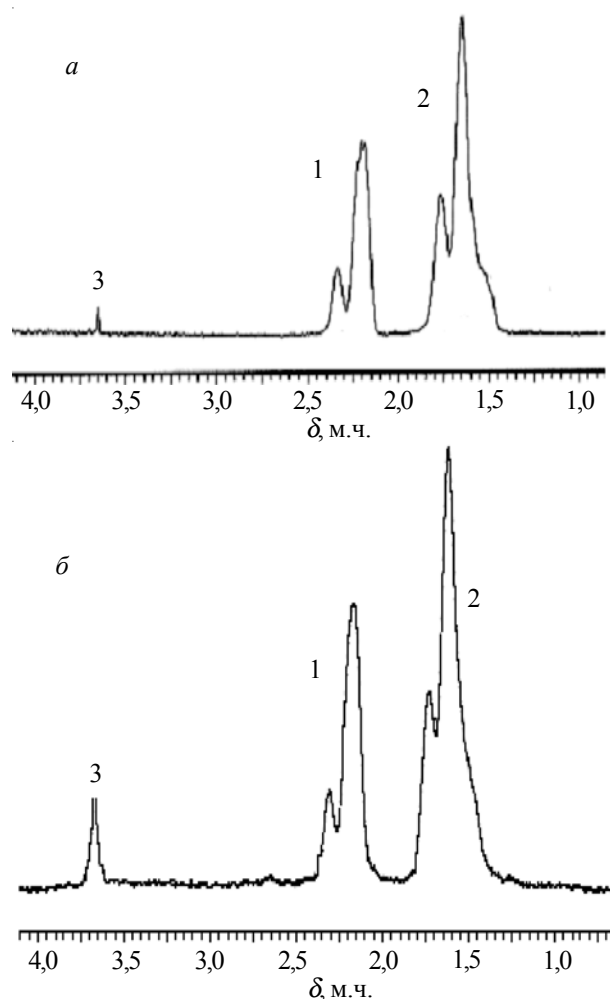


Рис. 2. ¹H ЯМР-спектри ДБК (а) та ТБК (б) у D₂O. $C_{\text{ДБК/ТБК}}=10$ кг·м⁻³

Випробування *in vitro* цитотоксичної дії Dox, інкапсульованого в міцели ТБК і ТБК-СООН, проводили на клітинах лінії L1210 гострого лейкозу миші, трансформованих фібробластів (лінія L929) миші та лейкозних Т-лімфоцитів (лінія Jurkat) людини. Клітини ліній L1210 і L929 культивували у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), а клітини лінії Jurkat – у середовищі RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) за наявності 10 % сироватки крові великої рогатої худоби. Інкубацію клітин проводили за температури 37 °C у 96-луноквих планшетах (“Falcon”, США), у CO₂-інкубаторі (“JENCONS NUAIRE”, Англія) в атмосфері 5 % CO₂ і 95 % повітря.

Результати дослідження та їх обговорення.

Раніше було встановлено, що для процесів блок-кополімеризації ПАА з МОПЕГ і ПЕГ були характерні динамічні матричні ефекти: зменшення або збільшення швидкості блок-кополімеризації та конверсії мономеру порівняно з гомополімеризацією АА, проведеною за аналогічних умов [22, 23], а також структурний матричний ефект, а саме зростання довжини блоків ПАА при підвищенні довжини матриць – блоків (МО)ПЕО. Це було пов'язано з утворенням між ланцюгами (МО)ПЕО і зростаючими “дочірніми” ланцюгами ПАА кооперативної системи водневих зв'язків [24, 25]. Знак і величина динамічного матричного ефекту складним чином залежала від довжини блоків (МО)ПЕО та концентрацій ініціатора і мономеру. Отримані ДБК і ТБК розчинялись у воді, проте за рахунок взаємодії хімічно комплементарних блоків і розвитку процесів міцелютворення ці розчини демонстрували ледь помітну опалесценцію.

Приклади ¹H ЯМР-спектрів, записаних у D₂O для зразків ДБК і ТБК, показані на рис. 2. Їх інтерпретацію проводили у відповідності з даними попередніх досліджень [26]. Спектри демонстрували сигнали протонів >CH- (1) та –CH₂- груп (2) блоків ПАА з величинами хімічного зсуву $\delta=2,1\text{--}2,4$ та $1,4\text{--}1,9$ м.ч., а також сигнал протонів –CH₂- груп (3) блоків (МО)ПЕО з величиною $\delta=3,70$ м.ч. Крім того, в спектрі ДБК (рис. 2а) проявлявся слабкий сигнал протонів кінцевих –OCH₃-груп з $\delta=3,38$ м.ч.

Використовуючи інтегральні інтенсивності (А) відповідних сигналів протонів, розраховували ММ блоків ПАА у складі ДБК і ТБК за такими формулами:

$$P_{n \text{ ПАА(ДБК)}} = \frac{2 \cdot P_{n \text{ МОПЕГ}} \cdot A_2}{A_3}; P_{n \text{ ПАА(ТБК)}} = \frac{P_{n \text{ ПЕГ}} \cdot A_2}{A_3}, \quad (2)$$

де: A_2 і A_3 – інтегральні інтенсивності сигналів 2 і 3 відповідно. Отже, було встановлено асиметричний характер синтезованих ДБК і ТБК (табл. 1).

Окрему частину ТБК далі піддавали частковому лужному гідролізу, щоб перетворити невелику кількість амідних груп у карбоксильні і, за рахунок цього, посилити взаємодію позитивно зарядженого гідрохлориду доксорубіцину з міцелярними носіями. FTIR-спектр

Таблиця 1. Молекулярні параметри диблок- і триблок-кополімерів за даними ^1H ЯМР-спектроскопії

Кополімер	$M_{n(\text{МО)ПЕО}}$, кДа	$M_{n\text{ПAA}}$, кДа	$M_{n\text{ДБК/ТБК}}$, кДа	n^{**}
ДБК	5	222	227	27,6
ТБК	6	116	238	12,1

* Молекулярну масу ТБК розраховували за формулою: $M_{\text{ТБК}} = M_{\text{нПЕО}} + 2M_{\text{ПAA}}$.

** Співвідношення між кількістю ланок у ПAA і (МО)ПЕО блоках.

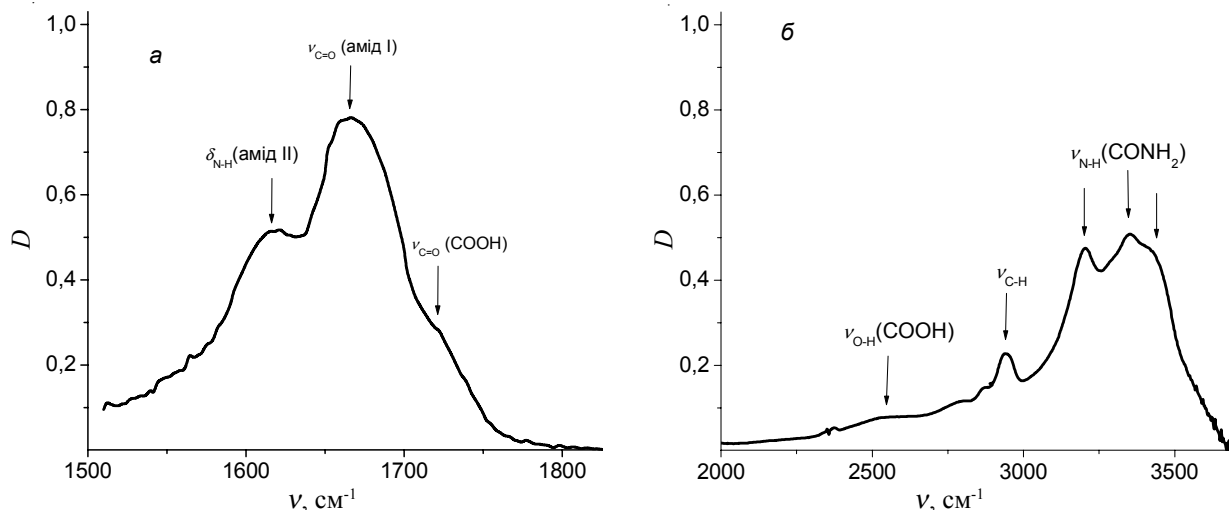


Рис. 3. Приклад FTIR-спектра тонкої плівки ($l \sim 10$ км) зразка ТБК-СООН в областях $\nu_{\text{C=O}}$, $\delta_{\text{N-H}}$ (а) та $\nu_{\text{N-H}}$, $\nu_{\text{C-H}}$ і $\nu_{\text{O-H}}$ коливань (б)

для отриманого таким чином модифікованого зразка ТБК-СООН показаний на рис. 3.

В спектрі частково гідролізованих кополімерів крім традиційних смуг коливань $\nu_{\text{C=O}}$ (амід I), $\delta_{\text{N-H}}$ (амід II) (рис. 3а), а також смуг $\nu_{\text{N-H}}$ (CONH_2) (рис. 3б), які притаманні вихідним зразкам ДБК/ТБК і характеризують зв'язані різними видами водневих зв'язків амідні групи блоків ПAA [27], з'являються нові смуги $\nu_{\text{C=O}}$ (СООН) та $\nu_{\text{O-H}}$ (СООН) за ~ 1722 та ~ 2550 cm^{-1} відповідно. Ці смуги відображають коливання Н-зв'язаних карбоксильних груп, що утворюються на ланцюгах ПAA макромолекул ДБК і ТБК у результаті часткового гідролізу акриламідних ланок.

Ступінь гідролізу акриламідних ланок у модифікованому зразку ТБК-СООН характеризували методом потенціометричного титрування у варіанті розрахунку кривої поглинання гідроксил-іонів, який застосовують для слабких поліелектролітів (рис. 4) [21]. Крива поглинання мала чіткий S-подібний характер, що давало змогу точно знайти граничну величину поглинання, яка відповідала загальній кількості гідролізованих амідних груп. Ступінь гідролізу (A) акриламідних ланок визначали за формулою:

$$A = \frac{\sigma_{\text{lim}} \cdot 10^{-3}}{n_{\text{ПAA}}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

де: σ_{lim} – гранична величина поглинання гідроксил-іонів на рис. 4 за $\text{pH} \sim 8$, $\text{мг-екв} \cdot \text{г}^{-1}$; $n_{\text{ПAA}}$ – кількість ланок ПAA у вихідному зразку ТБК, $\text{осн-моль} \cdot \text{г}^{-1}$. Таким чином, було отримано зразок ТБК-СООН зі ступенем гідролізу

акриламідних ланок $A=10,7\%$.

Блоки (МО)ПЕО і ПAA в ДБК і ТБК є хімічно комплементарними і в результаті взаємодії за рахунок кооперативних водневих зв'язків утворюють інтрамолекулярні полікомплекси (ІнтраПК) [22–25]. Це зумовлює особливості їх синтезу (наявність матричних ефектів у процесах блок-кополімеризації) і приводить до формування в розбавлених водних розчинах специфічних міцелярних структур з комплексним “ядром” і стабілізуючою “коронаю” з надлишкових, незв'язаних з (МО)ПЕО,

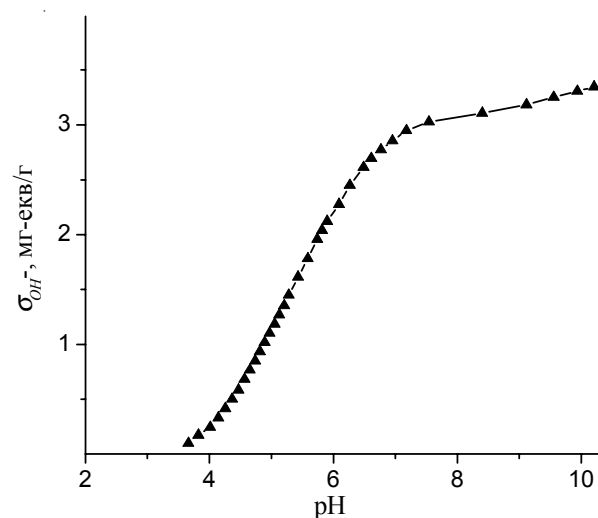


Рис. 4. Залежність величини поглинання гідроксил-іонів від pH , розрахована за даними титрування ТБК-СООН і “холостого” розчину (води) $0,2$ н. NaOH . $C_{\text{ТБК}} = 1$ $\text{кг} \cdot \text{м}^{-3}$, $T = 25$ $^{\circ}\text{C}$

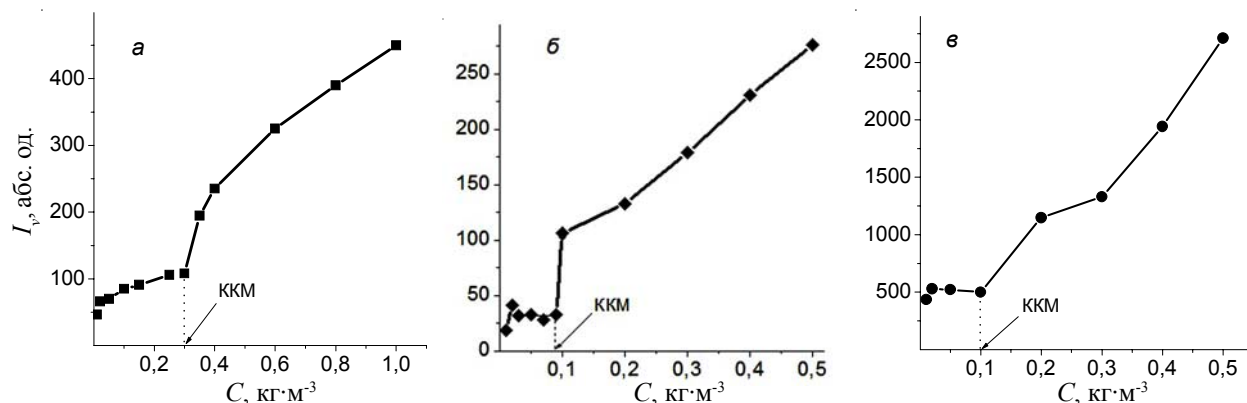


Рис. 5. Концентраційні залежності інтенсивності розсіювання вертикально поляризованого світла за $\lambda=520$ нм і $\theta=90^\circ$ для ДБК (а), ТБК (б) та ТБК-СООН (в)

Таблиця 2. Термодинамічні характеристики міцелоутворення в водних розчинах

Кополімер	ККМ $\cdot 10^7$, моль $\cdot \text{дм}^{-3}$	$-\Delta G^\circ$, кДж $\cdot \text{моль}^{-1}$
ДБК	13,19	32,98
ТБК	3,78	36,15
ТБК-СООН	3,98	36,14

ланок більш довгих ПАА-блоків [22, 25]. З іншого боку, (МО)ПЕО і ПАА-блоки відомі як нетоксичні і біосумісні складові різноманітних кополімерів блочного типу, що застосовують у біомедицині, а перші з них здатні навіть до біодеградації у середовищі живого організму.

Стабільність міцелярних структур синтезованих блок-кополімерів у водному середовищі характеризували шляхом визначення критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) та стандартної вільної енергії міцелоутворення Гіббса ($-\Delta G^\circ$), використовуючи пружне

світлорозсіювання. Відповідні приклади показані на рис. 5. Стандартну вільну енергію Гіббса розраховували за величиною ККМ і добре відомим співвідношенням [28]:

$$\Delta G^\circ \approx RT \ln \text{ККМ} \quad (4)$$

Отримані параметри міцел зібрані в табл. 2. Як видно, для всіх зразків кополімерів були характерні дуже малі величини ККМ і великі значення енергії Гіббса, що свідчило про високу стабільність міцел ДБК і ТБК та ТБК-СООН у воді і, завдяки тому, про перспективність їх використання для інкапсуляції і транспортування в середовищі живого організму погано розчинних і токсичних лікарських субстанцій. Було встановлено зменшення ККМ і збільшення енергії Гіббса, тобто збільшення стабільності міцел при переході від ДБК до ТБК. Було показано також, що значення ККМ та $-\Delta G^\circ$ для зразка ТБК-СООН, який містив невелику частку карбоксильних груп, практично не відрізнялися від

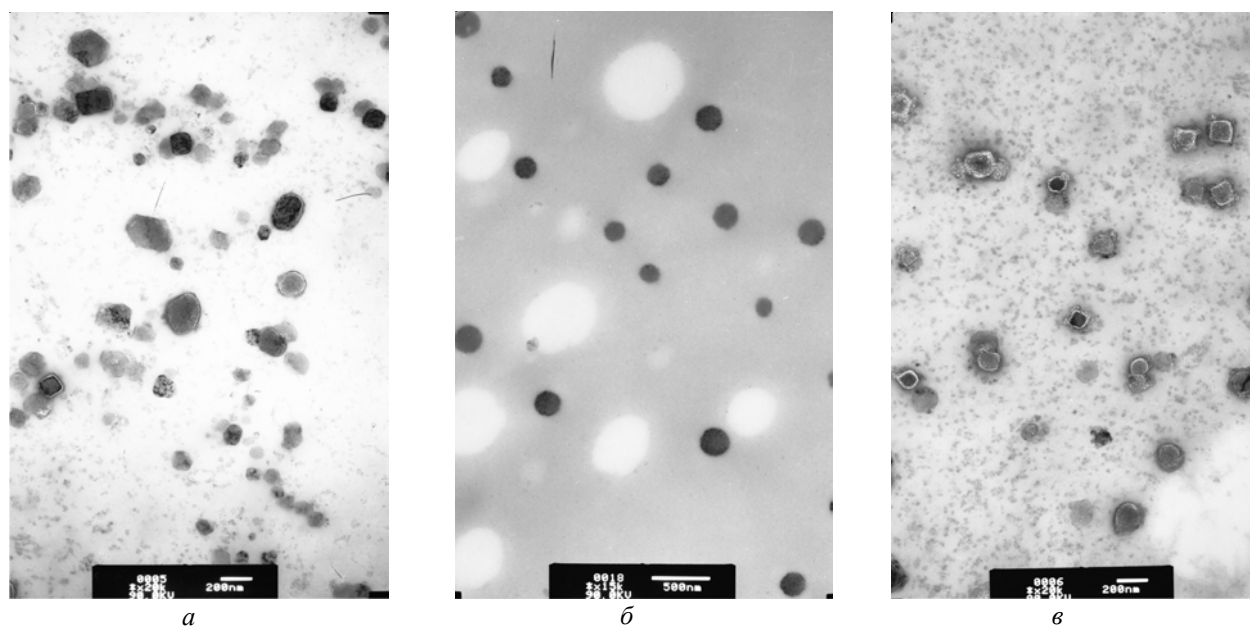


Рис. 6. Електронні мікрофотографії міцел ДБК (а) і ТБК (б, в) при меншому (б) і більш сильному збільшенні (в). $C_{\text{ДБК/ТБК}}=0,2 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$

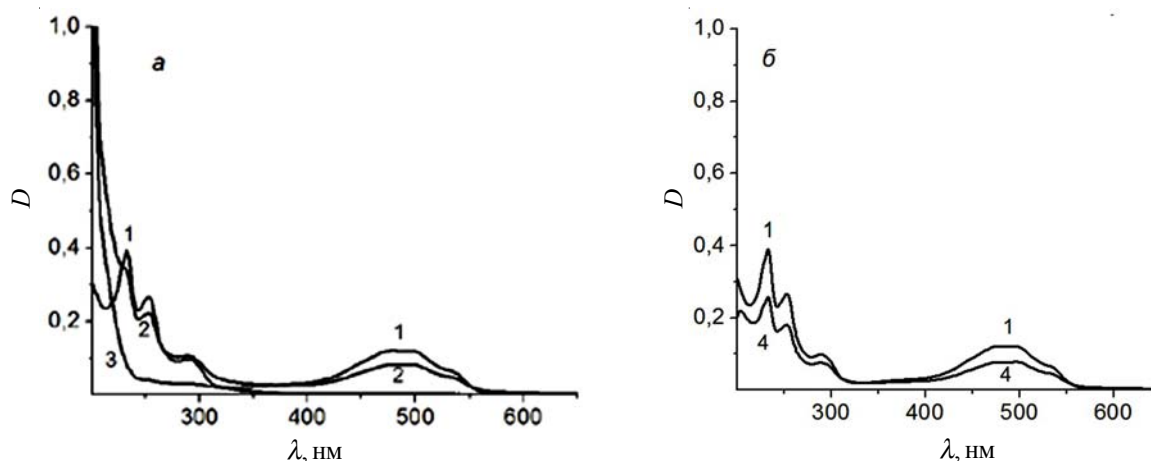


Рис. 7. УФ-спектри водних розчинів Дох -1 (а, б), композиції Дох/ДБК -2 (а) та ДБК -3 (а), а також різниці спектрів поглинання (Дох/ДБК-ДБК) -4 (б). $C_{\text{Дох}}=2,5 \cdot 10^{-5}$ моль·дм⁻³, $C_{\text{ДБК}}=0,12$ кг·дм⁻³, $T=20$ °С

аналогічних параметрів для немодифікованого зразка ТБК (рис. 5б, в; табл. 2).

Морфологічні особливості і розмір міцел ДБК та ТБК, які визначали методом ТЕМ, показані на рис. 6. На отриманих електронних мікрофотографіях (рис. 6) проявлялись не тільки відносно великі і переважно сферичні міцели полімолекулярного типу розміром 45÷230 нм для ДБК і 80÷240 нм для ТБК, а й міцели мономолекулярного типу (малі темні точки на мікрофотографіях) діаметром 15÷30 нм, які були фактично індивідуальними ІнтраПК.

Для інкапсуляції протипухлинного препарату Дох використовували розчини блок-кополімерів, що містили моно- та полімолекулярні міцели ТБК, оскільки концентрація кополімерів ($C=1$ кг·м⁻³) перевищувала ККМ (табл. 2). Молекули гідрохлориду Дох крім розвинутої гідрофобної частини містили також гідроксильні, карбонільні, етерні та позитивно заряджені аміногрупи, тому слід було очікувати їх активну взаємодію з міцелами ДБК і ТБК та, особливо, ТБК-СООН. Для підтвердження взаємодії Дох з міцелами блок-кополімерів у водних розчинах використовували УФ-спектроскопію (рис. 7).

УФ-спектр водного розчину Дох (рис. 7, спектр 1) містив 5 інтенсивних смуг поглинання за 233, 253, 289, 480 та 495 нм [25], зумовлених наявністю "антрахінонового" фрагмента молекули з системою π та n електронів. У спектрі міцелярного розчину ДБК спостерігали лише слабку смугу в області 240–300 нм, яка відповідала, очевидно, $n \rightarrow \pi^*$ переходу електронів у $-\text{CONH}_2$ -групах (рис. 7а, спектр 3). Таким чином, зміна спектральних характеристик Дох давала інформацію щодо ефектів взаємодії з міцелами блок-кополімерів. Зміни інтенсивності та положення смуг електронних переходів у молекулах Дох у композиціях з блок-кополімерами можна було прослідкувати шляхом порівняння спектра чистого Дох і різниці спектрів композиції та чистого кополімеру. Ці дані показані на рис. 7б і в

Таблиця 3. Зміна положень смуг поглинання Дох у композиції з міцелами диблок-кополімеру

Система	Розчинник	λ_{max} , нм				
		Дох	233	253	289	480
Дох/ДБК	Н ₂ О	233	253	290	482	497

табл. 3. Результатом такого порівняння став висновок про батохромний зсув багатьох смуг поглинання Дох (табл. 3) в композиції з блок-кополімерами, а також зменшення їх інтенсивності. Наявність помітних відмінностей положень максимумів смуг та їх інтенсивностей відобразило зміну розподілу електронної густини в молекулах Дох під впливом взаємодії з міцелами ДБК.

Враховуючи більшу стабільність міцел ТБК і ТБК-СООН порівняно з міцелами ДБК у водних розчинах, саме перші два види міцел використовували для тестування протиракової активності композицій з Дох. В цих експериментах порівнювали дію вільного Дох,

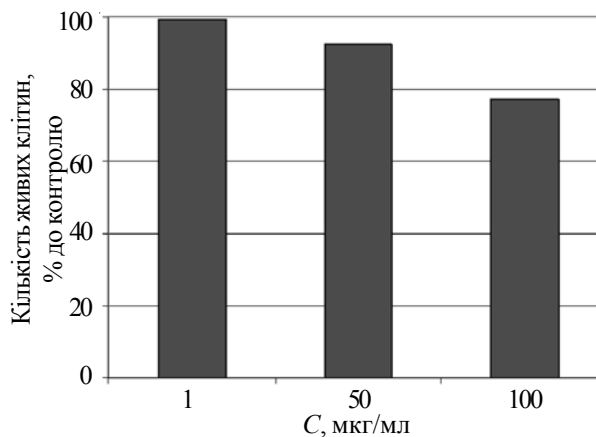


Рис. 8. Динаміка кількості клітин Т-лейкозу людини лінії Jurkat за наявності в культуральному середовищі міцел ТБК-СООН різної концентрації через 24 год інкубації. Контроль (без додавання міцел) – 100 %

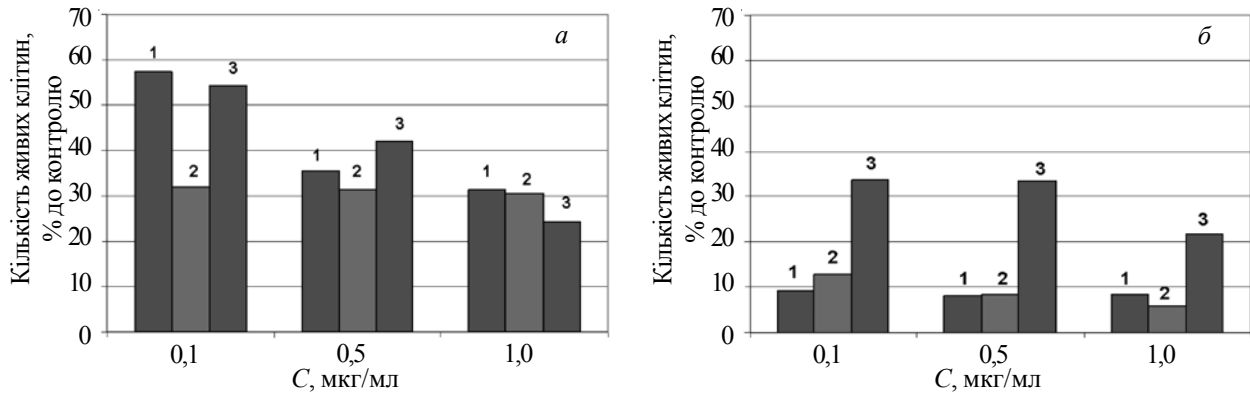


Рис. 9. Динаміка кількості живих клітин Т-лейкемії людини залежно від концентрації Dox, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного Dox -3 через 24 (а) та 48 год інкубації (б)

міцелярного носія з інкапсульованим препаратом і вільного носія. Напівлетальною (LD_{50}) дозою Dox для досліджуваних клітин вважали концентрацію $1 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$. Ефективність дії досліджуваних речовин визначали за кількістю живих клітин у порівнянні з контролем, тобто клітинами, які інкубували без додавання протипухлинного препарату. Підрахунок кількості клітин здійснювали через 24 та 48 год після початку інкубації у гемоцитометричній камері Горяєва. Для підрахунку кількості відмерлих клітин проводили фарбування трипановим синім.

Було встановлено, що модифікований кополімер ТБК-СООН, діючи за високої концентрації $50 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ протягом 24 год, мало зменшував кількість живих клітин Т-лейкозу людини (рис. 8). За дози $100 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ кількість клітин Т-лейкозу людини знижувалася більш ніж на 20%.

Деякі інші результати випробувань подані на рис. 9–11. Вони, зокрема, демонструють, що через 24 год інкубації цитотоксична дія Dox, інкапсульованого в міцели ТБК-СООН, по відношенню до клітин Т-лейкозу людини збільшувалась при зростанні його концентрації від 0,1 до $1 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ і була більшою за дію вільного Dox та препарату, інкапсульованого в міцели немодифікованого ТБК (відповідно, у 1,64 і 1,73 раза за концентрації Dox $0,1 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ та у 1,31 і 1,44 раза за

концентрації Dox $0,5 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$) (рис. 9а).

Разом з тим, за концентрації вільного Dox $1 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ він проявляв більшу активність, ніж препарат, що був інкапсульований в міцели ТБК і ТБК-СООН. Результати, отримані через 48 год інкубації (рис. 9б), ще більше переконували в тому, що міцелярні композиції на основі ТБК і ТБК-СООН були ефективнішими (у 2,8–4,2 раза), ніж вільний Dox за всіх досліджених концентрацій.

Аналогічну картину спостерігали при дії вільного та інкапсульованого Dox на клітини лінії L1210 гострого лейкозу миші (рис. 10). В цих експериментах найбільш активною виявилась міцелярна система Dox/ТБК-СООН. Через 24 год інкубації ефективність дії Dox у цих міцелярних носіях була вищою за ефективність дії вільного препарату у 1,70, 1,79 і 1,83 раза за концентрацій 0,01; 0,10 та $1,00 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ відповідно (рис. 10а). Аналогічні порівняльні розрахунки за даними, отриманими через 48 год інкубації (рис. 10б), показали більш високу ефективність дії інкапсульованого препарату у 1,93, 3,40 і 4,50 раза за вказаних вище концентрацій відповідно. Характерно, що наявність обох міцелярних систем у культуральному середовищі з доданим Dox за концентрації $1 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ через 48 год викликала майже повну загибель злоякісних клітин (на відміну від дії

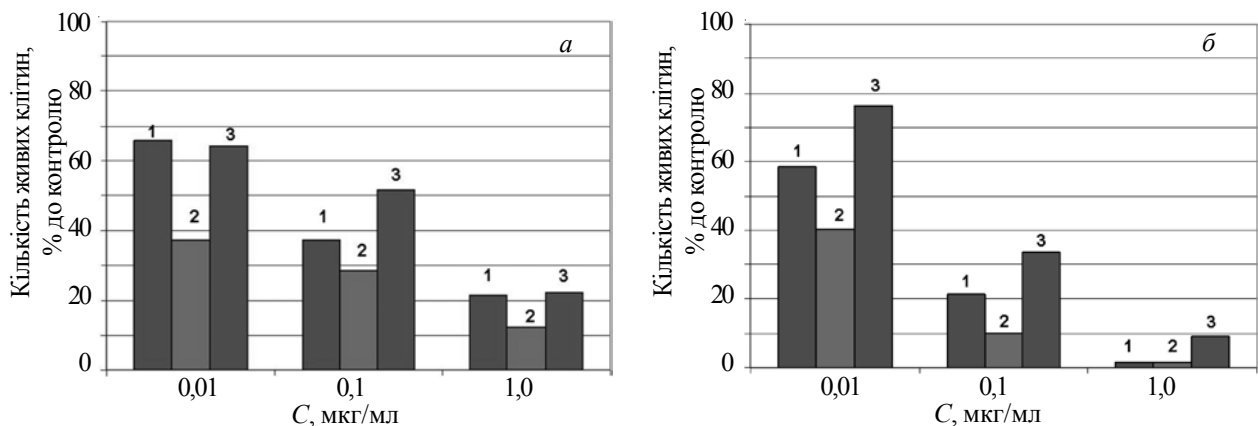


Рис. 10. Динаміка кількості живих клітин гострого лімфолейкозу миші за наявності Dox, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного Dox -3 через 24 (а) та 48 год інкубації (б)

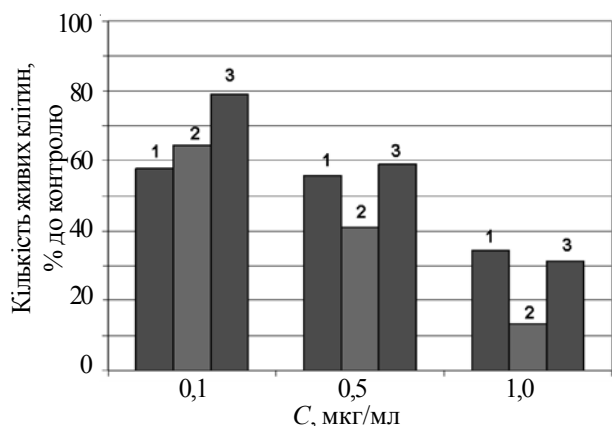


Рис. 11. Динаміка кількості живих трансформованих фібробластів миші за наявності Dox, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного Dox -3. Тривалість інкубації 24 год

вільного Dox). Вивчення динаміки кількості живих трансформованих фібробластів L929 миші у випадку наявності в культуральному середовищі Dox, інкапсульованого в міцели ТБК і ТБК-СООН, також свідчило про те, що цей протипухлинний препарат у міцелярних носіях діє більш ефективно, ніж вільна форма цього препарату (рис. 11). У цих тестах більшу активність щодо знищення пухлинних клітин проявила, як і раніше, міцелярна система Dox/ТБК-СООН. Ефективність її дії перевищила дію вільного Dox у 1,23; 1,44 і 2,37 раз

Література

1. Форстер Л. Нанотехнологии. Наука, инновации и возможности. – Техносфера, 2014. – 2461 с.
2. Torchilin V.P.(Ed.) Nanoparticulates as drug carriers. – London: Imperial College Press, 2006 – 754 p.
3. Tong R., Cheng J. Anticancer polymeric nanomedicines // Polym. Rev. – 2007. – 47. – P.345-381.
4. Attia A.B.E., Ong Z.Y., Hedrick J.L., Lee P.P., Ee P.L.R., Hammond P.T., Yang Y.-Y. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery // Curr. Opin. Coll. Int. Sci. – 2011. – 16, P.182-194.
5. Osada K., Christie R.J., Kataoka K. Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amine acid) block copolymer for drug and gene delivery // J. Royal Soc. Interface. – 2009. – 6. – P. S325-S339.
6. Dane K.Y., Nembrini C., Tomei A.A., Eby J.K., O'Neil C.P., Velluto D., Swartz M.A., Inverardi L., Hubbell J.A. Nano-sized drug-loaded micelles deliver payload to lymph node immune cells and prolong allograft survival // J. Contr. Release – 2011. – 156. – P.154-160.
7. Zhang Q., Ko N.R., Oh J.K. Recent advances in stimuli-responsive degradable block copolymer micelles: synthesis and controlled drug delivery // Chem. Commun. – 2012. – 48. – P. 7542-7552.
8. Freichels H., Jerome R., Jerome C. Sugar-labeled and

за концентрацій протипухлинного препарату 0,1, 0,5 і 1,0 мкг·см⁻³ відповідно.

Висновки.

Отже, методом радикальної матричної блок-кополімеризації синтезовано асиметричні диблок- та триблок-кополімери МОПЕО-*b*-ПАА та ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА за участю хімічно комплементарних, біосумісних і частково біодеградабельних (метокси)поліетиленоксиду та поліакриламідів з різною довжиною блоків. Шляхом часткового лужного гідролізу триблок-кополімеру отримано зразок ТБК-СООН зі ступенем гідролізу акриламідних ланок 10,7%.

Показано, що такі блок-кополімери утворюють у воді специфічні і переважно сферичні міцели моно- та полімолекулярного типів за рахунок інтрамолекулярної взаємодії хімічно комплементарних блоків, які характеризуються малими значеннями ККМ і великими значеннями вільної енергії Гіббса, що свідчить про перспективність використання їх для інкапсуляції і транспортування в середовищі живого організму погано розчинних і токсичних лікарських субстанцій.

Встановлено, що використання міцел подвійних гідрофільних блок-кополімерів ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА і, особливо, їх частково гідролізованих похідних як носіїв протипухлинного препарату доксорубіцину посилює цитотоксичну дію препарату і дає змогу у перспективі зменшити його загальну токсичність при застосуванні в хімотерапії завдяки суттєвому зниженню активної терапевтичної дози.

PEGylated (bio)degradable polymers intended for targeted drug delivery systems // Carbohydrate Polym. – 2011. – 86. – P. 1093-1106.

9. Матяш М., Кравчук Т., Высоцкая В., Чернов В., Гольдберг В. Индуцированная антрациклинами кардиотоксичность: механизмы развития и клинические проявления // Сибирский онкол. журн. - 2008. - № 6. - С.66-75.
10. Самура Б. Повреждения миокарда, индуцированные антрациклинами. Диагностика и лечение // Therapia. - 2008. - №12. – С. 46-52.
11. Sakthibalan M., Sawadkar M.S., Asmathulla S, Ivan E.A., Muthu G. Study of cardio protective effect of N-acetylcysteine, Vitamin C // J. Pharm. Biomed. Sci. – 2013. – 36. – P. 1902-1908.
12. Noh T., Kook Y.H., Park C., Youn H., Kim H., Oh E.T., Choi E.K., Park H.J., Kim C. Block copolymer micelles conjugated with anti-EGFR antibody for targeted delivery of anticancer drug // J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem. – 2008. – 46. – P.7321-7331.
13. Glen S., Marcus L. Micelle composition of polymer and passenger drug // US Patent № 8,173,167. - Issued date 08.05.2012.
14. Xu Y., Meng F., Cheng R., Zhong Z. Reduction-sensitive

- reversibly crosslinked biodegradable micelles for triggered release of doxorubicin. // *Macromol. Biosci.* - 2009. - **9**. - P. 1-7.
15. Евразийский патент 017682 В1. Полимер и способ его получения, фармацевтическая композиция в форме наночастиц, способ и набор для ее получения и способ лечения патологических состояний у людей или животных. // *Ананд Б., Рама М., Дхирадждж Х., Санджой М., Ма-ну Д., Кумар С., Мукеш К., Дипак П., Кумар Г., Раджендран П., Шобхит С.* - Оpubл. 28.02.2013.
16. Патент РФ 2308943 С2. Композиции полимерных мицелл // *Леру Ж-К., Бенахмед А.С.* - Оpubл. 27.10.2007.
17. Дзун М. Новый твердый препарат, содержащий блок-сополимер и атрациклиновый противоопухолевый препарат, и способ его получения // Патент РФ № 2321412. Оpubл. 10.04.2008.
18. *Heller G., Ng S.-Y.* PEG-POE, PEG-POE-PEG, and POE-PEG-POE block copolymers // US Patent No: 5,939,453. - Issued date 17.08.1999.
19. *Kunitskaya L., Zheltonozhskaya T., Berkova S.* Block-Copolymers of Polyacrylamide with Poly(Ethylene Oxide) forming Intramolecular Polycomplexes // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* - 2008. - **497**. - P. 282-291
20. *Zheltonozhskaya T., Nedashkovskaya V., Khutoryanskiy V., Gomza Yu., Fedorchuk S., Klepko V., Partsevskaya S.* Micelles of PAAm-b-PEO-b-PAAm triblock copolymers and their binding with prednisolon // *Molecular Cryst. Liquid Cryst.* - 2011. - **536**. - P. 380-391.
21. *Желтоножская Т.Б., Поп Г.С., Еременко Б.В., Усков И.А.* Исследование свойств и конформаций в растворе сополимера стирола с N,N-диэтиламинопропил-моноамидом малеиновой кислоты // *Высокомолекуляр. соединения.* - 1981. - **23**, № 11. - С. 2425-2435.
22. *Куницька Л., Желтоножська Т., Беркова С.* Кинетика блок-кополімеризації акриламід у монометилловими етерами поліетиленгліколю різної молекулярної маси // *Вопр. химии и хим. технологии.* - 2007. - № 3. - С. 74-77.
23. *Желтоножская Т.Б., Федорчук С.В., Гомза Ю.П., Пермякова Н.М., Сыромятников В.Г.* Влияние внутримолекулярного комплексообразования на структуру блок-сополимеров, включающих полиакриламид и полиэтиленоксид // *Вопр. химии и хим. технологии.* - 2007. - **8**, № 2. - С. 78-87.
24. *Федорчук С.В., Желтоножська Т.Б., Пермякова Н.М., Гомза Ю.П., Барабаш М.Ю., Куницький Ю.А.* Наноструктуровані А-Ь-В-Ь-А триблок-кополімери з гідрофільними хімічно комплементарними компонентами // *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології.* - 2011. - **8**, № 4. - С. 869-889.
25. *Kunitskaya L.R., Aleinichenko V.A., Zheltonozhskaya T.B., Berkova S.A.* Nanostructured Triblock Copolymers, Forming Intramolecular Polycomplexes, for Solar Cells and Lithium Batteries // *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* - 2010. - **42**, No. 2. - P. 109-113.
26. *Zheltonozhskaya T., Partsevskaya S., Fedorchuk S., Klymchuk D., Gomza Yu., Permyakova N., Kunitskaya L.* Micellar nanocontainers based on PAAm-b-PEO-b-PAAm triblock copolymers for poorly soluble drugs. // *Europ. Polym. J.* - 2013. - **49**, No 2. - P. 405-418.
27. *Kunitskaya L., Zheltonozhskaya T., Permyakova N., Kobylinska N.* Double hydrophilic block copolymers for doxorubicin delivery // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* - 2014. - **590**. - P. 164-171.
28. *Riess G.* Micellization of block copolymers // *Prog. Polym. Sci.* - 2003. - **28**. - P. 1107-1170.

Надійшла до редакції 9 листопада 2015 р.

Мицеллярные композиции с доксорубицином и их цитотоксичность

Л.Р. Куницькая¹, Т.Б. Желтоножская¹, Р.С. Стойка², Н.М. Бойко²

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

ул. Владимирская, 60. 01033 Киев, Украина

²Институт биологии клетки НАН Украины

ул. Драгоманова, 14/16, 79005 Львов, Украина

*Исследованы мицеллярные композиции с доксорубицином, в которых носителями токсичного противоракового препарата являются мицеллы диблок- и триблок-сополимеров (ДБС и ТБС) с асимметричными химически комплементарными блоками (метокси)полиэтиленоксида и полиакриламида (МОПЕО-*b*-ПАА и ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА), а также частично гидролизованное производное триблок-сополимера (ТБС-СООН). Показано, что исходные блок-сополимеры и продукты их щелочного гидролиза образуют в воде специфические мицеллы моно- и полимолекулярного типа с малым значением критической концентрации мицеллообразования за счет интрамолекулярного взаимодействия химически комплементарных блоков. Установлено, что мицеллярные композиции ТБС и ТБС-СООН с противоопухолевым препаратом доксорубицином усиливают цитотоксическое действие препарата, что позволяет в перспективе уменьшить его общую токсичность при использовании в химиотерапии благодаря существенному снижению терапевтической дозы.*

Ключевые слова: полиэтиленгликоль, полиакриламид, мицеллярные композиции, противоопухолевые препараты

Micellar compositions with doxorubicin and their cytotoxicity

L.R. Kunitskaya¹, T.B. Zheltonozhskaya¹, R.S. Stoika², N.M. Boiko²

¹Kiev Taras Shevchenko National University

60 Vladimirska Str., 01033, Kiev, Ukraine

²Institute of Cell Biology NAS of Ukraine

14/6 Dragomanova Str., 79005 Lviv, Ukraine

*The micellar compositions with doxorubicin, in which the carriers of toxic anticancer drug are micelles of diblock- and triblock copolymers (DBC and TBC) containing asymmetric chemically complementary (methoxy)polyethylenoxide and polyacrylamide (MOPEO-*b*-PAAm and PAAm-*b*-PEO-*b*-PAAm) and also partially hydrolyzed triblock copolymer's derivative (TBC-COOH) were investigated. It is shown, that both initial and hydrolyzed block copolymers form special micelles of mono- and polymolecular type in aqueous medium. Such micelles have small CMC due to the intramolecular interaction of chemically complementary blocks. It has been found that micellar compositions of TBC and TBC-COOH with anticancer agent doxorubicin increase the cellulotoxic action of the drug and allowed to reduce its general toxicity due to the lowering of the therapeutic dose when used in chemotherapy.*

Key words: polyethylene glycol, polyacrylamide, micellar compositions, anticancer drugs.