



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *in vitro* НОВЫХ НАНОРАЗМЕРНЫХ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ЦИСПЛАТИНА

Մ.Ա.ԿԱԶԱՐՅԱՆ¹, Ն.Տ. ԲԱԲԱՅԱՆ², Ր.Մ. ԳՐԻԳՐՅԱՆ², Ն.Կ. ՏԱՐԿԻՏՅԱՆ²,
Ժ.Ա.ՍՈՍՅԱՆ², Յ.Մ. ՓԱՐՄԱԶՅԱՆ³, Ե.Ր.ԱՐԱԿԵԼՈՎԱ³

¹ГОУ ВПО Российско - Армянский (Славянский) университет

²Институт молекулярной биологии НАН РА

³Государственный инженерный университет Армении
shkazarian1@gmail.com

На протяжении последнего десятилетия фармакологические компании всего мира были нацелены на создание противоопухолевых препаратов нового поколения. Однако проблемы, связанные с малой селективностью по отношению к опухолевым клеткам, высокой токсичностью по отношению к здоровым тканям и органам, быстрым привыканием опухолевых клеток все еще являются непреодолимым барьером в ходе этого процесса. Одним из приоритетных направлений в решении данных проблем являются нанотехнологии, которые предоставляют возможность целенаправленной доставки лекарств в опухолевые клетки, при этом сводя к минимуму токсическое воздействие на здоровые. В работе представлены данные исследования *in vitro* противоопухолевой активности и опухолевой специфичности наноразмерных композитов ZnO на основе цисплатина, соединенного с различными полимерными типами поливинилалкоголя. Было выявлено, что наличие в структуре наночастиц ZnO обуславливает опухолевую специфичность препаратов. Также было показано, что в составе наноразмерных композитов происходит резкое понижение уровня базальной цитотоксичности цисплатина. Исследованные композиты обладают более высоким уровнем опухолевой специфичности по сравнению с цисплатином, а их противоопухолевая активность обусловлена цитостатическим эффектом, которая приводит к смерти опухолевых клеток по апоптотическому пути.

Цисплатин - ZnO - нанотехнология - противоопухолевая активность -
цитотоксичность

Վերջին տասնամյակի ընթացքում ամբողջ աշխարհի դեղաբանական կազմակերպությունները նպատակաուղղված են ստեղծելու նոր սերնդի հակառնուցքային դեղամիջոցներ: Սակայն խնդիրները՝ կապված ռնուցքային բջիջների նկատմամբ փոքր ընտրողականության, առողջ հյուսվածքների և օրգանների նկատմամբ բարձր տոկսիկության հետ և ռնուցքային բջիջների արագ հակման հետ՝ դեռևս անհաղթահարելի խոչընդոտ են հանդիսանում այս գործընթացում: Տվյալ խնդիրների լուծման մեջ առաջնապահային ուղղություններից մեկն են հանդիսանում նանոտեխնոլոգիաները, որոնք հնարավորություն են տալիս դեղամիջոցների նպատակաուղղված առաքումը

դեպի ուռուցքային բջիջները, միաժամանակ առողջ բջիջների նկատմամբ տոկոսիկ ազդեցությունը հասցնելով նվազագույնի: Աշխատանքում ներկայացված են հակաուռուցքային ակտիվության և ուռուցքային յուրահատկության տվյալները նանոչափսային ZnO միացությունների ցիտատոքսիկ և տարբեր տիպի պոլիմերների հետ միասին պոլիմերների հիման վրա *in vitro* պայմաններում: Նաև ցույց է տրվել, որ նանոչափսային միացությունների կազմության մեջ կատարվում է ցիտատոքսիկ բազային ցիտոստոքսիկության մակարդակի կտրուկ նվազում: Հետազոտված միացությունները օժտված են հակաուռուցքային ակտիվության ավելի բարձր մակարդակով, քան ցիտատոքսիկ և նրանց հակաուռուցքային ակտիվությունը պայմանավորված է ցիտոստատիկ ազդեցությամբ, որը բերում է ուռուցքային բջիջների մահվանը ապոպտոտիկ ճանապարհով:

Ցիտատոքսիկ - ZnO - նանոտեխնոլոգիաներ - հակաուռուցքային ակտիվություն - ցիտոստոքսիկություն

Over the last decade pharmaceutical companies around the world were aimed at creating a new generation of anticancer drugs. However, the problems connected with low selectivity of tumor cells, high toxicity to healthy tissues and organs, rapid habituation of tumor cells still are unsurmountable barrier during the process. One of the priorities in addressing these problems are nanotechnology that enable targeted drug delivery to tumor cells and at the same time minimize toxic effects on the healthy ones. The paper presents research data on *in vitro* antitumor activity and tumor specificity nanoscale ZnO composites based on cisplatin, which is coupled with different types of polymer polyvinyl alcohol. It has been found that the presence of nanoparticles in the structure of ZnO causes tumor specificity of drugs. It has also been shown that there is a sharp reduction of Cisplatin basal cytotoxicity level in the composition of nanoscale composites. Studied composites have higher level of tumor specificity in comparison with Cisplatin, and their antitumor activity is caused by the cytostatic effect, which leads to tumor cell death by apoptotic pathway.

Cisplatin - ZnO - nanotechnology - antitumor activity - cytotoxicity

Применение достижений нанотехнологии в медицине предоставляет возможность не только диагностировать опухоль, но и позволяет лечить опухолевые болезни путем точечного воздействия на опухолевые клетки. Считается, что наночастица не изменяет механизм действия того лекарства, с которым она связана в составе композита. Наночастица лишь способствует лучшему проникновению вещества в клетку, и в зависимости от размера наночастиц наблюдается тот или иной эффект [3]. Так, считается, что оптимальное проникновение композита в опухолевую клетку обеспечивается в тех случаях, когда размер наночастиц составляет приблизительно 10-100 нм. Следует отметить также, что наночастицы размером 100 нм и более способны проникать в здоровые гепатоциты, таким образом проявляя гепатотоксичность [2].

В последнее десятилетие в качестве конъюгата лекарственных препаратов широко используются органические полимеры. Это способствует доставке лекарства к опухолевым клеткам за счет механизма пассивного транспорта конъюгата к опухолевым клеткам и его проникновения через сосудистые стенки опухолевых тканей. К органическим полимерам, используемым в медицине в качестве наночастиц, существуют свои требования, к которым относятся химическая инертность, нетоксичность, растворимость в воде, амфифильность, отсутствие примесей, возможность регулировать химические свойства, биосовместимость и возможность биodeградации [5].

Ранее было показано, что наночастицы ZnO запускают свободно-радикальные механизмы в делящихся опухолевых клетках, не повреждая нормальные неделящиеся клетки [1]. Во многом это и стало определяющим фактором в использовании именно наноразмерных композитов ZnO на основе цисплатина в исследованиях противоопухолевой активности. Показано также, что ZnO и цисплатин способны проявлять синергентный противоопухолевый эффект.

В работе представлены данные противоопухолевой активности и опухолевой специфичности новых наноразмерных композитов ZnO на основе цисплатина, соединенного с различными полимерными типами поливинилалкоголя (ПВС-5 и МПВС-13). Были исследованы также механизм противоопухолевой активности и путь клеточной гибели *in vitro*.

Материал и методика.

Исследованные соединения: образцы ПВС-5 и МПВС-13 были синтезированы в два этапа:

1. полимеризация винилацетата с мономерами, содержащими карбоксигруппу (производные малеинового ангидрида)
2. последующий щелочной алкоголиз поливинилацетата или его кополимеров

Содержание функциональных групп в ПВА (поливинилацетат) контролировалось путем изменения состояния синтеза. Содержание функциональных групп в кополимерах определялось путем химического анализа и кондуктометрического титрования. Молекулярная масса полимеров определялась с помощью гель-хроматографии («Waters» хроматограф). На рис. 1 представлено схематическое изображение ПВС-5 и МПВС-13, которые имеют схожее строение мономеров [8].

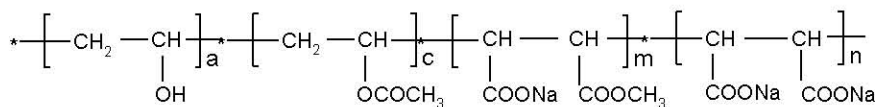


Рис. 1. Схематическое строение мономера ПВС-5 и МПВС-13 полимеров

Характеристики ПВС-5 и МПВС-13 представлены в табл 1.

Таблица 1. Характеристика структуры ПВС-5 и МПВС-13.

Производные ПВС	Молекулярная масса	Процентное содержание функциональных групп, %		
		a*	c*	m+n*
ПВС-5	65 000	98,4	1,6	-
МПВС-13	58 000	83,3	13,9	2,8

* Функциональные группы a, c и m+n представлены на рис. 1.

Клеточные линии: использовали опухолевые (HeLa и KCL-22) и нормальные (MRC5) клеточные линии человека. Клетки культивировали при 37°C в ростовой среде DMEM (HeLa и MRC5) и RPMI-1640 (KCL-22) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Определение цитотоксичности и опухолевой специфичности: клетки HeLa и MRC5 в концентрации $0,2-0,25 \times 10^6$ кл./мл культивировали в 96-луночных планшетах в течение 48 ч, после чего к ним добавляли исследуемое вещество в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 и 100 мкг/мл. Через 48 ч инкубации определяли выживаемость клеток с помощью NRU анализа согласно стандартному протоколу [9]. Измерения проводили с использованием, Microplate ELISE reader (Human Reader HS, Germany). Клетки KCL-22 в концентрации $0,5 \times 10^6$ кл./мл культивировали во флаконах в течение 48 ч, после чего к ним добавляли исследуемое вещество в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 и 100

мкг/мл. Через 48 ч инкубации определяли выживаемость клеток методом исключения витального красителя трипанового синего [4] с помощью камеры Горяева.

Исследование клеточного цикла и механизма клеточной смерти проводили на клеточной культуре KCL-22 с помощью проточной цитометрии. Клетки обрабатывали исследуемым веществом в концентрациях IC_{50} и $IC_{50/2}$ в течение 48 ч, после чего их промывали буфером PBS и фиксировали в холодном 70 %-ном этаноле при 4°C, далее проводили их окрашивание PI (0,1 мг/мл RNase и 0,05мг/мл пропидиум йодид) в течение 30 мин. [7]. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра FACScan (Beckton & Dickinson, San Jose), данные анализировали с помощью программы Modfit4.0.

Для анализа механизма клеточной смерти после фиксации клетки дважды промывали буфером (Cell Staining Buffer+ PBS+ 0.5% BSA+ 0/1% NaN_3), ресуспендировали в Annexin V Binding Buffer и добавляли 7-AAD и Annexin V. После 15 мин инкубации добавляли Annexin V Binding Buffer [8]. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра FACScan (Beckton & Dickinson, San Jose), данные анализировали с помощью программы FlowJo 8.7.

Все эксперименты были проведены трижды, по крайней мере, в четырех экземплярах для улучшения статистического значения. Все значения представлены как средние $\pm$ стандартная ошибка. Для статистической обработки данных использовался t-тест Стьюдента, за статистическую погрешность принималась $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Данные цитотоксичности (IC_{50}) и индекса опухолевой специфичности (ИС) исследованных соединений представлены в табл. 2.

Таблица 2. Цитотоксичность и индекс опухолевой специфичности цисплатина и его наноразмерных композитов.

Вещество	IC_{50} в опухолевых клетках (HeLa)	IC_{50} в нормальных клетках (MRC-5)	ИС
МПВС-13+CisPt	36	3	0.083*
МПВС-13+CisPt+ZnO	28	54	1.93*
ПВС-5+CisPt	56	44	0.79*
ПВС-5+CisPt+ZnO	39	58	1.48*
CisPt	2.1	2.4	1.14 ^{ns}

^{ns} – недостоверное отличие, $p > 0,05$; * - достоверное отличие, $p < 0,05$

Был выявлен высокий уровень цитотоксической активности цисплатина по отношению к нормальным и опухолевым клеткам. Будучи очень токсичным веществом, цисплатин не проявил избирательности по отношению к опухолевым клеткам в условиях *in vitro*. Полимеры МПВС-13, ПВС-5 и ZnO в исследуемых концентрациях не проявили цитотоксического эффекта ни в отношении опухолевых, ни в отношении нормальных клеток. Таким образом, МПВС-13 и ПВС-5 соответствуют требованиям, предъявляемым органическим нанополимерам, используемым в медицине.

Было показано, что МПВС-13+CisPt и ПВС-5+CisPt без нанопленки ZnO не обладают опухолевой специфичностью и являются более токсичными для нормальных клеток. Но введение в состав данных композитов нанопленки ZnO резко изменяет характеристику их специфичности. Добавление слоя ZnO к композиту МПВС-13+CisPt в 18 раз снизило токсичность композита по отношению к нормальным клеткам и в 1.3 раза повысило ее для опухолевых. Было показано, что МПВС-13+CisPt+ZnO почти в 2 раза более активен, чем цисплатин.

Таким образом, можно сделать вывод, что добавление нанопленки ZnO приводит к опухолевой специфичности композита. Композиты МПВС-13+CisPt+ZnO и ПВС-5+CisPt+ZnO являются менее токсичными для нормальных клеток и более избирательными к опухолевым клеткам, чем чистый цисплатин и композиты состава МПВС-13+CisPt и ПВС-5+CisPt.

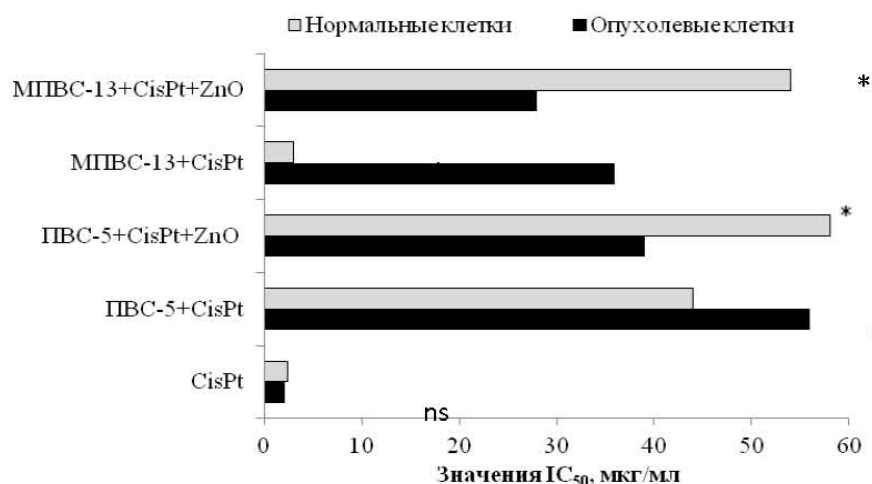


Рис. 2. Опухолевая специфичность исследованных композитов (ns-недостовверное различие, $p>0,05$; *-достовверное различие, $p<0,05$).

Анализ изменения клеточного цикла при воздействии композита был проведен для наиболее активного с точки зрения опухолевой специфичности композита МПВС-13+CisPt+ZnO. Результаты анализа клеточного цикла клеток KCL-22 методом проточной цитометрии после воздействия композитом МПВС-13+CisPt+ZnO и чистым цисплатином представлены на рис.3. Первый большой пик на каждом графике составляют клетки в G0/G1-фазе (содержание ДНК 2с) клеточного цикла, последующее плато составляют клетки в S- фазе клеточного цикла (содержание ДНК от 2с до 4с). Второй пик составляют клетки в G2/M-фазе (4с).

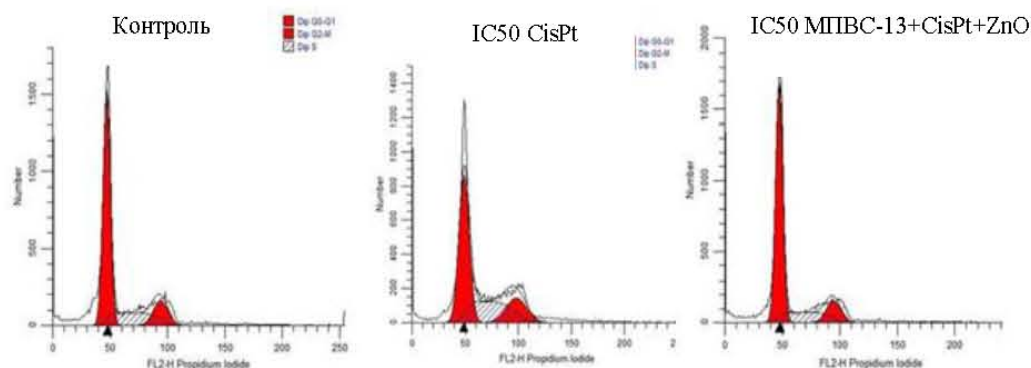


Рис.3 Клеточный цикл после 48 ч инкубации клеток KCL-22 с цисплатином и композитом МПВС-13+CisPt+ZnO в концентрациях, равных их IC₅₀.

Было обнаружено, что при воздействии МПВС-13+CisPt+ZnO происходит незначительное уменьшение количества клеток в S- и G2/M-фазах, однако увеличивается количество клеток в G0/G1- фазе. Это означает, что композит МПВС-13+CisPt+ZnO задерживает клеточный цикл в G0/G1- фазе, не позволяя клеткам входить в синтетическую фазу. В сравнении с цисплатином, который приводит к задержке клеточного цикла в S-фазе, композит МПВС-13+CisPt+ZnO проявил более слабый цитостатический эффект (рис. 4).

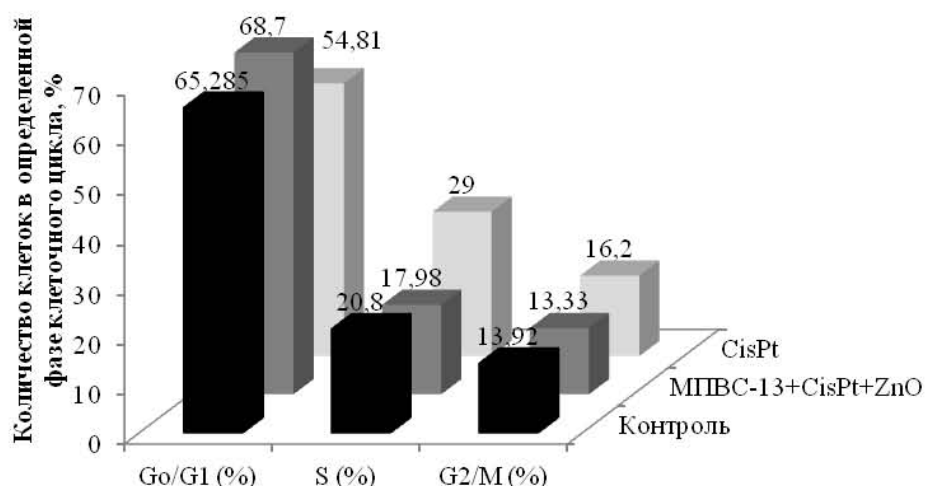


Рис. 4. Анализ изменения распределения клеток по клеточному циклу после воздействия композитом МПВС-13+CisPt+ZnO и CisPt в концентрации IC₅₀.

Важной характеристикой цитостатических соединений является также то, что в результате блокирования клеточного деления клетки погибают по апоптозному пути, что является предпочтительным при терапии опухолей, так как это позволяет ослабить воспалительную реакцию, индуцированную некротическими клетками или исключить ее полностью. Анализ механизма клеточной смерти выявил, что при воздействии композитом МПВС-13+CisPt+ZnO в субтоксической дозе 21% всех живых клеток вошли в стадию апоптоза.

Таким образом, наличие в структуре МПВС-13+CisPt+ZnO и ПВС-5+CisPt+ZnO композитов нанопленки ZnO приводит к повышению опухолевой специфичности (в 23,3 и 1,9 раза соответственно). Также было определено повышение опухолевой специфичности для данных композитов по сравнению с чистым цисплатином. Изучение противоопухолевой активности композита МПВС-13+CisPt+ZnO выявило увеличение опухолевой специфичности почти в 2 раза, по сравнению с таковой для чистого цисплатина. Результаты изучения противоопухолевой активности МПВС-13+CisPt+ZnO и ПВС-5+CisPt+ZnO *in vitro* показывают высокий потенциал наноразмерных композитов ZnO для использования в противоопухолевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аракелова Э.Р., Хачатрян А.М., Авджакян К.Э., Арамян Н.С., Геворкян В.А., Григорян С.Г., Мирзоян Г.Н. «Осаждение высокоомных ориентированных пленок ZnO при низких температурах методом DC- магнетронного напыления на стеклянных, Si и PEDOT-PSS, PEDOT-PSS (ПВС) подложках», Известия НАН Армении, Физика, 46(6), 451-460, 2011.
2. Девис М. «Терапия наночастицами: новый способ лечения рака», <http://www.foodingredients.ru>
3. Терещенко В. П., Картель Н. Т. «Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы», Киев «Наукова думка», 2010.

4. Bio-Protocol, «Propidium Iodide Staining of Cells for FACS Analysis», <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=195#.U1D09KLcTcc>, 2012.
5. Medina C., Santos-Martinez M. J., and Radomski M.W. «Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance», *Br J Pharmacol.* 150(5):552-8, 2007.
6. Rasmussen et al. «Zinc oxide nanoparticles for selective destrucyion of tumor cells and potential for drug delivery applications», *Expert Opin Drug Deliv.* 7, 1063-1077, 2010.
7. Sigma Aldrich, «Annexin V-FITC Apoptosis Detection», <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/apoafbul.pdf>, 2012.
8. Sigma Aldrich, «In vitro toxicology kit Neutral Red», <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox4bul.pdf>, 2010.
9. Sigma Aldrich, «Trypan Blue solution. Cell Culture Tested», <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html#trypan-blue>, 2012.