

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ПОНОМАРЕНКО СТАНІСЛАВ ІГОРОВИЧ

УДК 576.36/.385:615.3/.9.014:620.3

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ ДОКСОРУБЦИНУ ТА ЦИСПЛАТИНУ
У СКЛАДІ pH- І ТЕРМО-ЧУТЛИВИХ РОЗГАЛУЖЕНИХ ПОЛІМЕРІВ**

Спеціальність – 091 «Біологія»

Галузь знань – 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ С.І. Пономаренко

Науковий керівник: Прилуцький Юрій Іванович,
доктор фізико-математичних наук, професор

КИЇВ - 2025

АНОТАЦІЯ

Пономаренко С.І. ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ ДОКСОРУБЦИНУ ТА ЦИСПЛАТИНУ У СКЛАДІ рН- І ТЕРМО-ЧУТЛИВИХ РОЗГАЛУЖЕНИХ ПОЛІМЕРІВ. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – «Біологія») – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України, – Київ, 2025.

Вперше створено нові водорозчинні протипухлинні препарати на основі рН- і термо-чутливих розгалужених полімерів, D-g-PAAan і D(D6 або D70)-g-PNIPAM, відповідно, які містять молекули Dox та Cis, що підтверджено даними інфрачервоної спектроскопії і динамічного розсіювання світла.

За використання МТТ-тесту та аналізу живі/мертві клітини не виявлено токсичної дії водорозчинних частинок полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM на нормальні (HEK293 та HEL299) та пухлинні клітини (MC3T3, A549, HeLa, LLC і LLC/DoxR) у досліджуваних концентраціях, що свідчить про перспективність їх використання як безпечної наноплатформи для доставки протипухлинних ліків.

За використання поєднаних методів вискоефективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії показано, що полімерна матриця D-g-PAAan, яка містила Dox або Cis, вивільняла хіміопрепарат у відповідь на зниження рН середовища до 5,0 (модель пухлинного сайту), що вказує на можливість його цільової доставки, викликані зміною рН.

За використання конфокальної мікроскопії продемонстровано поглинання частинок D-g-PAAan+Dox та D-g-PNIPAM+Dox пухлинними клітинами MC3T3 та HeLa.

Виявлено концентраційно- та часо-залежне посилення токсичних ефектів цитостатиків Dox або Cis у складі полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM у досліджуваних системах *in vitro*. Так, частинки D-g-PAAan значно

підвищували токсичний потенціал хіміопрепаратів Dox та Cis у їх складі щодо клітин карциноми легень людини та миші (A549 та LLC), але не щодо нормальних клітин легень людини (HEL299). Навантажені хіміопрепаратом (Dox або Cis) частинки D-g-PAAan сприяли подальшому окисному стресу та індукції апоптозу у клітинах LLC шляхом підвищення внутрішньоклітинного продукування АФК та активності каспази 3/7. Виявлені селективні цитотоксичні ефекти протипухлинних препаратів Dox і Cis за їх інкапсуляції у полімерну матрицю D-g-PAAan свідчать про диференціацію взаємодії між новоствореними комплексами та пухлинними і нормальними клітинами, відповідно, що підтверджує перспективність їх використання у протипухлинній терапії.

Посилення внутрішньоклітинного накопичення Dox при транспортуванні у складі полімеру D-g-PAAan та модулюючий ефект цитотоксичності хіміотерапевтичних препаратів Dox і Cis у складі полімеру D-g-PAAan, підтверджені на 3D сфероїдній моделі клітин LLC, свідчать про перспективність застосування водорозчинних частинок полімеру D-g-PAAan для цільової доставки хіміопрепаратів у системи *in vivo*.

Цитотоксична дія Dox і Cis у складі комплексів полімерів D(D6 або D70)-g-PNIPAM є значно ефективнішою, ніж їхня токсична дія окремо щодо чутливих і резистентних до Dox клітин лінії LLC, про що свідчило підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, зниження вмісту АТФ та посилення активності каспази 3/7 порівняно з окремою дією цих цитостатиків за еквівалентної концентрації.

Встановлено, що токсичність Cis у комплексах D(D6 або D70)-g-PNIPAM щодо клітин LLC підвищується за низьких концентрацій хіміопрепарату. Крім того, чутливість клітин LLC/DoxR до дії досліджуваних комплексів полімерів D(D6 або D70)-g-PNIPAM з хіміопрепаратами була вищою порівняно з чутливими клітинами LLC, що свідчить про посилення цитотоксичних ефектів хіміопрепаратів полімерами та модифікацію процесів стійкості у клітин до цитостатиків.

Токсична дія поглинених клітинами HeLa частинок D70-g-PNIPAM+Dox значно зростала зі збільшенням концентрації Dox. Оскільки водорозчинний полімер D70-g-PNIPAM сильно чутливий до температури середовища, можна припустити, що потрапляючи у патологічні ділянки з підвищеною температурою ($\sim 37^\circ\text{C}$), частинки D70-g-PNIPAM зазнаватимуть конформаційної перебудови і, таким чином, вивільнятимуть ліки локально. Відтак, включення Dox до структури D70-g-PNIPAM дозволяє не лише оптимізувати його фармакокінетику, але й підвищити діючу концентрацію препарату.

Таким чином, одержані вперше результати свідчать про те, що запропонована стратегія інкапсуляції протипухлинних препаратів у полімерні матриці D-g-PAAan і D-g-PNIPAM дозволяє не лише реалізувати відповідне рН- і термо-таргетне вивільнення хіміопрепаратів, але й посилити їх токсичну дію на пухлинні клітини.

Ключові слова: розгалужені полімери/кополімери, полімер наноносій, доксорубіцин, цисплатин, комплекси/нанокомплекс, ІЧ поглинання, зв'язок структура-активність, протиракова активність, цитотоксичність, біохімічне характеризування/біохімічні показники, плазматична мембрана, доставка ліків, активні форми кисню, окисний стрес, окисний метаболізм

SUMMARY

Ponomarenko S.I. CYTOTOXICITY OF DOXORUBICIN AND CISPLATIN IN COMPOSITION OF pH- AND THERMO-SENSITIVE BRANCHED POLYMERS. - Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 "Biology" (09 – "Biology") - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine - Kyiv, 2025.

New water-soluble anticancer drugs based on pH- and thermo-sensitive branched polymers, D-g-PAAan and D(D6 or D70)-g-PNIPAM, respectively, containing Dox and Cis molecules, were created for the first time, which was confirmed by infrared spectroscopy and dynamic light scattering data.

Using the MTT test and live/dead cell analysis, no toxic effect of water-soluble particles of D-g-PAAan and D-g-PNIPAM polymers on normal (HEK293 and HEL299) and tumor cells (MC3T3, A549, HeLa, LLC and LLC/DoxR) was detected in the studied concentrations, which indicates the prospect of their use as a safe nanoplatform for the delivery of anticancer drugs.

Using the combined methods of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, it was shown that the D-g-PAAan polymer matrix, which contained Dox or Cis, released the chemopreparation in response to a decrease in the pH of the medium to 5.0 (tumor site model), indicating the possibility of its targeting of delivery caused by a change in pH.

Using confocal microscopy, the uptake of D-g-PAAan+Dox and D-g-PNIPAM+Dox particles by MC3T3 and HeLa tumor cells was demonstrated.

A concentration- and time-dependent enhancement of the toxic effects of the Dox or Cis cytostatics in the composition of D-g-PAAan and D-g-PNIPAM polymers was revealed in the studied *in vitro* systems. So, the D-g-PAAan particles significantly increased the toxic potential of Dox and Cis chemopreparations in their composition against human and mouse lung carcinoma cells (A549 and LLC),

but not against normal human lung cells (HEL299). Chemodrug (Dox or Cis)-loaded D-g-PAAAn particles promoted subsequent oxidative stress and apoptosis induction in LLC cells by increasing intracellular ROS production and caspase 3/7 activation. The revealed selective cytotoxic effects of the Dox and Cis antitumor drugs after their encapsulation in the D-g-PAAAn polymer matrix testify to the differentiation of the interaction between the newly formed complexes and tumor and normal cells, respectively, which confirms the perspective of their use in antitumor therapy.

The enhancement of intracellular accumulation of Dox during transport in the composition of the D-g-PAAAn polymer and the modulatory effect of the cytotoxicity of Dox and Cis chemotherapy drugs in the composition of the D-g-PAAAn polymer, confirmed on a 3D spheroid model of LLC cells, testify to the promising application of water-soluble particles of the D-g-PAAAn polymer for the targeted delivery of chemotherapy drugs in the *in vivo* system.

The cytotoxic action of Dox and Cis in the composition of D(D6 or D70)-g-PNIPAM polymer complexes is significantly more effective than their toxic action alone against the Dox-sensitive and resistant LLC cells, which was evidenced by an increase in the intracellular level of ROS, a decrease in the content of ATP and activation of caspase 3/7 compared to by the separate action of these cytostatics at an equivalent concentration.

It was established that the toxicity of Cis in the D(D6 or D70)-g-PNIPAM complexes against LLC cells increases at low concentrations of the chemotherapy drug. In addition, the sensitivity of LLC/DoxR cells to the action of the studied D(D6 or D70)-g-PNIPAM polymer complexes with chemopreparations was higher compared to sensitive LLC cells, which indicates an enhancement of the cytotoxic effects of chemopreparations by polymers and a modification of the processes of cell resistance to cytostatics.

The toxic effect of D70-g-PNIPAM+Dox particles absorbed by HeLa cells increased significantly with increasing Dox concentration. Since the water-soluble D70-g-PNIPAM polymer is highly sensitive to the temperature of the environment,

it can be assumed that when entering the pathological areas with elevated temperature ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), the D70-g-PNIPAM particles will undergo conformational rearrangement and thus release drugs locally. Therefore, the inclusion of Dox in the structure of D70-g-PNIPAM allows not only to optimize its pharmacokinetics, but also to increase the effective concentration of the drug.

Thus, the results obtained for the first time indicate that the proposed strategy of encapsulation of anticancer drugs in the D-g-PAAan and D-g-PNIPAM polymer matrices allows not only to realize the appropriate pH- and thermo-targeted release of chemopreparations, but also to enhance their toxic effect on tumor cells.

Key words: branched polymers/copolymers, polymer nanocarrier, doxorubicin, cisplatin, complexes/nanocomplex, structure-activity relationship, IR absorption, anticancer activity, cytotoxicity, biochemical characterization/biochemical indicators, plasma membrane, drug delivery, reactive oxygen species, oxidative stress, oxidative metabolism

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в іноземних виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus:

1. Yurchenko A, Nikitina N, Sokolova V, Prylutska S, Kuziv Yu, Virych P, Chumachenko V, Kutsevol N, **Ponomarenko S**, Prylutskyu Yu, Epple M. A novel branched copolymer - containing anticancer drug for targeted therapy: *in vitro* research. **BioNanoSci.**, 2020, V. 10, N 1, P. 249-259. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00700-5> **(Q3)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*
2. Chernykh M, Zavalny D, Sokolova V, **Ponomarenko S**, Prylutska S, Kuziv Yu, Chumachenko V, Marynin A, Kutsevol N, Epple M, Ritter U, Piosik J, Prylutskyu Yu. A new water-soluble thermosensitive star-like copolymer as a promising carrier of the chemotherapeutic drug doxorubicin. **Mater.**, 2021, V. 14, N 13: 3517. Doi: 10.3390/ma14133517 **(Q2)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*
3. Grebinyk A, Prylutska S, Grebinyk S, **Ponomarenko S**, Virych P, Chumachenko V, Kutsevol N, Prylutskyu Yu, Ritter U, Frohme M. Drug delivery with pH-sensitive star-like dextran-graft polyacrylamide copolymer. **Nanoscale Adv.**, 2022, V. 4, N 23, P. 5077-5088. <https://doi.org/10.1039/D2NA00353H> **(Q1)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*
4. Prylutska S, Grebinyk A, **Ponomarenko S**, Gövem D, Chumachenko V, Kutsevol N, Petrovsky M, Ritter U, Frohme M, Piosik J, Prylutskyu Yu. Toxicity of water-soluble D-g-PNIPAM polymers in a complex with chemotherapy drugs and mechanism of their action *in vitro*. **Int. J. Mol. Sci.**, 2024, V.25, N 5: 3069. Doi: 10.3390/ijms25053069 **(Q1)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні*

літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)

Апробація результатів досліджень на наукових конференціях:

1. **Ponomarenko S**, Kuziv Yu, Sokolova V, Virych P, Chumachenko V, Kutsevol N, Prylutsky Yu, Ritter U, Epple M. Cytotoxicity of chemotherapeutic drugs loaded into a pH-sensitive star-like copolymer. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2020)"; 2020: 238, Lviv, Ukraine.
2. **Ponomarenko S**, Grebinnyk A, Prylutska S, Grebinnyk S, Chumachenko V, Kutsevol N, Prylutsky Yu, Frohme M. Drug delivery with pH-sensitive star-like Dextran-Graft Polyacrylamide copolymer. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2022)"; 2022: 239, Lviv, Ukraine.
3. **Ponomarenko S**, Prylutska S, Grebinnyk A, Chumachenko V, Kutsevol N, Frohme M, Prylutsky Yu. Drug delivery with thermosensitive star-like Dextran-graft-Poly-N-iso-Polyacrylamide copolymer. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2023)"; 2023: 289, Lviv, Ukraine.
4. **Ponomarenko S**, Prylutska S, Grebinnyk A, Chumachenko V, Kutsevol N, Ritter U, Frohme M, Prylutsky Yu. *In vitro* toxic effect of water-soluble D-g-PNIPAM polymers in a complex with traditional chemotherapy drugs. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2024)"; 2024: 304, Uzhhorod, Ukraine.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	12
ВСТУП	13
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1 Розгалужені полімери: синтез та властивості	17
1.2 Розгалужені полімери як таргетні носії хіміопрепаратів	19
1.3 Використання хіміопрепаратів Cis і Dox в експериментальній онкології	22
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1 Матеріали та фізико-хімічні методи їх дослідження	27
2.2 Лінії нормальних і пухлинних клітин та умови їх культивування	29
2.3 Оцінка життєздатності клітин за використання МТТ-тесту	30
2.4 Аналіз живі/мертві клітини	30
2.5 Конфокальна мікроскопія	31
2.6 Оцінка вивільнення хіміопрепаратів Cis і Dox з полімеру	31
2.7 Оцінка вмісту АФК у клітинах	33
2.8 Оцінка рівня АТФ у клітинах	33
2.9 Оцінка активності каспази 3/7 у клітинах	34
2.10 Формування та оцінка життєздатності 3D сфероїдів у культурі клітин	34
2.11 Флуоресцентна мікроскопія	35
2.12 Статистична обробка даних	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1 Структурна організація комплексів полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis у водному середовищі	
3.1.1 Комплекси полімеру D-g-PAAan з хіміопрепаратами Dox і Cis	36
3.1.2 Комплекси полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis	40
3.2 Токсичність та внутрішньоклітинна локалізація комплексів полімеру D-g-PAAan з хіміопрепаратами Dox і Cis щодо клітин HeLa і MC3T3	
3.2.1 Цитотоксичність комплексів полімеру D-g-PAAan з	

хіміопрепаратами Dox і Cis	48
3.2.2 Внутрішньоклітинна локалізація комплексу D-g-PAAn+Dox	52
3.3 Токсичність комплексів полімеру D-g-PAAn з хіміопрепаратами Dox і Cis щодо клітин LLC миші, A549 людини і нормальних клітин HEL299 легень людини та механізм їх дії <i>in vitro</i>	
3.3.1 Вивільнення хіміопрепаратів Dox і Cis з полімеру D-g-PAAn	54
3.3.2 Життєздатність клітин LLC, A549 і HEL299 за дії комплексів полімеру D-g-PAAn з хіміопрепаратами Dox і Cis	55
3.3.3 Продукування АФК у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PAAn з хіміопрепаратами Dox і Cis	60
3.3.4 Активність каспази 3/7 у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PAAn з хіміопрепаратами Dox і Cis	62
3.3.5 Утворення 3D сфероїдів клітин LLC за дії комплексів полімеру D-g-PAAn з хіміопрепаратами Dox і Cis	64
3.4 Токсичність комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis щодо клітин LLC і HeLa та механізм їх дії <i>in vitro</i>	
3.4.1 Життєздатність клітин LLC і HeLa за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis	67
3.4.2 Продукування АФК у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis	74
3.4.3 Вміст АТФ у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis	77
3.4.4 Активність каспази 3/7 у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis	79
3.4.5 Внутрішньоклітинна локалізація комплексу D-g-PNIPAM+Dox у клітинах HeLa	81
УЗАГАЛЬНЕННЯ	83
ВИСНОВКИ	86
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	87

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Активні форми кисню - АФК

Високоефективна рідинна хроматографія - ВРХ

Декстран-поліакриламід в аніонній формі - D-g-РААan

Декстран–полі-N-ізопропілакриламід - D-g-PNIPAM

Доксорубіцин – Dox

Дисперсійний аналіз - ANOVA

Диференціальна скануюча калориметрія - DSC

Індекс полідисперсності - PDI

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є - FTIR

Клітинна лінія остеобластів миші - MC3T3

Клітинна лінія, отримана з нирки ембріону людини - HEK293

Клітини карциноми легені людини - A549

Клітини карциноми легені миші - LLC

Культуральне середовище DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

Метод динамічного розсіювання світла - DLS

МТТ – барвник 3-[4, 5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід

Напівінгібуюча концентрація - IC₅₀

Резистентна лінія LLC до доксорубіцину - LLC/DoxR.

Трансформовані епітеліальні клітини шийки матки людини - HeLa

Фібробласти легень людини – клітинна лінія HEL299

Фосфатно-сольовий буфер - PBS

Флуоресцентний барвник 2,7-дихлорфлуоресцин діацетат - DCFH-DA

Флуоресцентний барвник 4',6-діамідин-2-феніліндол - DAPI

Цисплатин – Cis

ВСТУП

Актуальність теми. Хіміотерапія наразі є найбільш поширеним терапевтичним підходом у лікуванні раку. Проте існують значні обмеження за її використання, зокрема висока токсичність щодо здорових тканин та низька доза ліків, які безпосередньо потрапляють у пухлинний сайт. Нові біотехнології за використання біосумісних і біодоступних полімерних матриць, як таргетних наносистем доставки ліків, здатні мінімізувати негативний вплив хіміотерапії щодо нормальних клітин і тканин організму.

Гібридні наноструктури, створені на основі розгалужених полімерних матриць, які реагують на зовнішні фактори, наприклад, значення рН чи температуру оточуючого середовища (патологічного стану), є трендом розвитку сучасної біомедицини. Ефективне застосування таких полімерних наноматеріалів залежить від їх фізико-хімічних властивостей, зокрема можливості контролювати конформаційний перехід полімерів, розмір наночастинок, інкорпорованих у полімер, та здатності до їх локального вивільнення. Відтак, такі полімерні системи розглядають як перспективні наноплатформи для адресної доставки ліків у злоякісні пухлини, для яких характерні закислене середовище та вища температура порівняно зі здоровою тканиною. Тому створення та фізико-хімічні дослідження рН- і термо-чутливих нанокомпозитів «полімер - протипухлинний препарат» з метою оптимізації їх складу та фармакокінетики, скринінг протипухлинної активності на різних клітинних лініях залежно від температури і рН буферного середовища, що дозволить знизити дозу високотоксичного протипухлинного препарату, одночасно підвищивши його ефективну локальну дію та зменшивши побічну дію щодо нормальних тканин і органів, є актуальною задачею хіміотерапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в межах науково-дослідної тематики кафедри біофізики та нейробиології «Біофізичні ефекти і механізми дії

електромагнітних полів, наноматеріалів та фармакологічних речовин на біологічні об'єкти» (№ державної реєстрації 0106U005751), проєкту НФДУ «Молекулярний дизайн, створення, *in vitro* та *in vivo* скринінги нанокомплексів природних алкалоїдів із C₆₀ фулереном для підвищення ефективності терапії метастатичного раку» (№ державної реєстрації 0121U111200) та німецько-українського проєкту «Зіркоподібні pH- і термо-чутливі біосумісні полімери як перспективні наноносії для адресної доставки протипухлинних препаратів» (DFG № RI 966/19-1).

Метою роботи було дослідити токсичну дію водорозчинних комплексів pH- і термо-чутливих розгалужених полімерів з хіміопрепаратами доксорубіцин (Dox) та цисплатин (Cis) на пухлинні клітини різного походження.

Відповідно до мети були поставлені такі **завдання**:

1. створити комплекси pH- (D-g-PAAan, декстран-поліакриламід в аніонній формі) і термо- (D-g-PNIPAM, декстран–полі-N-ізопропілакриламід) чутливих розгалужених полімерів з хіміопрепаратами Dox і Cis та дослідити їх структурну організацію у водному середовищі;
2. дослідити динаміку вивільнення хіміопрепаратів Dox і Cis з полімеру D-g-PAAan у відповідь на зміну pH середовища;
3. дослідити проникнення комплексів полімерів D-g-PAAan та D-g-PNIPAM з хіміопрепаратом Dox у пухлинні клітини;
4. дослідити часо- та концентраційнозалежну токсичність комплексів полімерів D-g-PAAan та D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis щодо нормальних та пухлинних клітин;
5. з'ясувати потенційний механізм цитотоксичної дії комплексів полімерів D-g-PAAan та D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis.

Об'єкт дослідження: комплекси pH- і термо-чутливих розгалужених полімерів (D-g-PAAan і D-g-PNIPAM) з хіміопрепаратами Dox і Cis, пухлинні (MC3T3, A549, HeLa, LLC і LLC/DoxR) та нормальні (HEK293 і HEL299) клітини.

Предмет дослідження: цитотоксичність та внутрішньоклітинне проникнення комплексів полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis, механізм їх цитотоксичної дії, вивільнення хіміопрепаратів Dox і Cis з полімеру D-g-PAAan.

Методи дослідження: інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є, динамічне розсіювання світла, високоефективна рідинна хроматографія, мас-спектрометрія, конфокальна мікроскопія, люмінесцентний та флуоресцентний аналізи, МТТ-тест, аналіз живі/мертві клітини, статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше створено та охарактеризовано біобезпечні водорозчинні полімери (D-g-PAAan і D-g-PNIPAM) - носії протипухлинних препаратів Dox і Cis, здатних ефективно вивільняти їх у місцях патології, чому сприяє значення рН середовища і температури, і, таким чином, локально підвищувати діючу концентрацію. Доведено внутрішньоклітинне поглинання частинок D-g-PAAan+Dox та D-g-PNIPAM+Dox. *In vitro* скринінг протипухлинної активності Dox і Cis у складі полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM підтвердив посилення їх цитотоксичної дії навіть за низьких концентрацій та зменшення стійкості до них резистентних злоякісно-трансформованих клітин. Доведено, що цитотоксична дія Dox і Cis у складі полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM реалізується шляхом індукції апоптозу, про що свідчило підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, зниження вмісту АТФ та посилення активності каспази 3/7.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати, засновані на стратегії інкапсуляції протипухлинних препаратів Dox і Cis у полімерні матриці D-g-PAAan і D-g-PNIPAM, дозволяють не лише реалізувати відповідне рН- і термо-таргетне вивільнення цитостатиків, але й значно посилити їх токсичну дію на пухлинні клітини. Безумовно, вони є підґрунтям для розробки та апробації *in vivo* новітніх форм протипухлинних ліків на основі рН- і термо-чутливих розгалужених полімерів, оскільки їх

застосування дозволить знизити побічні ефекти хіміопрепаратів на нормальні клітини організму та одночасно посилити їх щодо злоякісних клітин.

Особистий внесок здобувача визначається участю у формулюванні мети і основних завдань роботи, аналізі літературних даних, плануванні та виконанні експериментальних досліджень, проведенні статистичного аналізу даних, інтерпретації та узагальненні одержаних результатів, формулюванні висновків роботи за участю наукового керівника та співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Одержані результати дисертації були апробовані на міжнародних конференціях "Nanotechnologies and Nanomaterials" (NANO-2020, 2022, 2023, Львів і NANO-2024, Ужгород), а також на наукових семінарах кафедри біофізики та нейробіології ННЦ "Інститут біології та медицини".

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 4 статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus та віднесених до кuartилів Q1, Q2 і Q3 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, а також 4 тези доповідей на міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, викладення методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення та висновків. Дисертаційну роботу викладено на 100 сторінках тексту. Вона містить 7 таблиць та 35 рисунків. Перелік використаної літератури включає 104 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Розгалужені полімери: синтез та властивості

Значну частину полімерів можна одержати за допомогою методу вільнорадикальної полімеризації [1]. Проте він недостатньо адаптований для синтезу розгалужених полімерів з визначеною архітектурою та низькою полідисперсністю. Зокрема, у цьому випадку важко контролювати кількість прищеплень та їх довжину. Водночас перевагами методу вільнорадикальної полімеризації є низька собівартість і простота технології синтезу [2,3].

Найкращим підходом щодо одержання контрольованої архітектури розгалужених полімерів є постадійний синтез: спочатку отримують полімер з незначним молекулярно-ваговим розподілом, а далі синтезують розгалужений полімер з визначеною кількістю прищеплень [3].

Одним з найбільш перспективних типів розгалужених макромолекул є полімери, що складаються з основного ланцюга та прищеплених бічних ланцюгів. Наразі існують такі підходи щодо їх хімічного синтезу [4-7] (рис. 1.1):

1. прищеплення попередньо синтезованих макромолекулярних ланцюгів до основного ланцюга. Перевагами цього підходу є можливість контролю кількості прищеплень, а також молекулярної ваги основного і бічних ланцюгів. Як недолік, варто відзначити неможливість одержання зіркоподібних полімерних структур внаслідок значного розміру макромолекулярних ланцюгів;

2. макромономерний синтез: спочатку отримують бічні ланцюги, на потім формують основний ланцюг. Так вдається одержати полімери з великою кількістю і щільністю розгалужень. Однак різна довжина основного ланцюга зумовлює полідисперсність таких полімерів;

3. спочатку формують активні центри на основному ланцюзі, а далі з цих центрів «виростають» бічні ланцюги внаслідок полімеризації мономерів. Цей підхід дозволяє одержати рівномірний розподіл розгалужень, контролювати

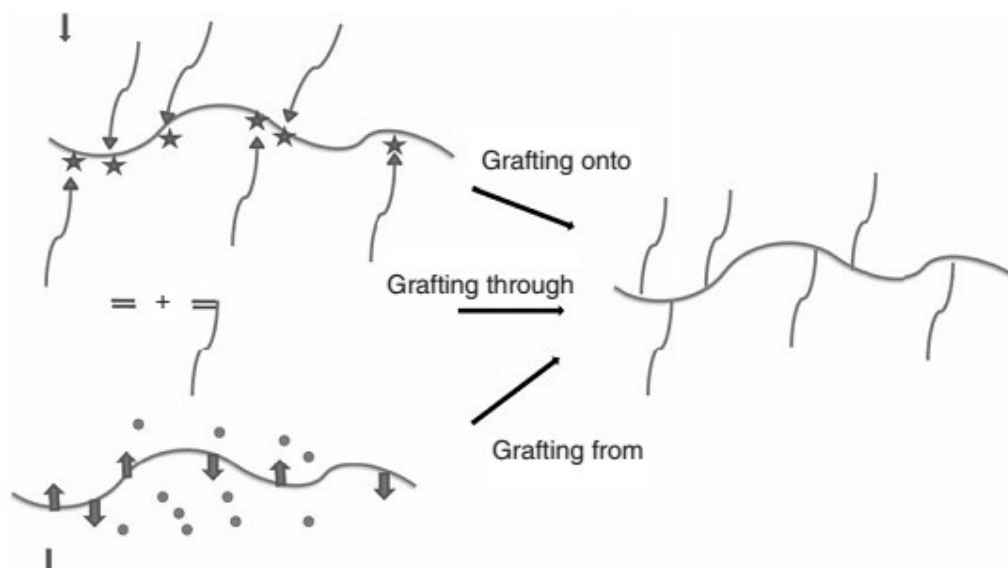


Рис. 1.1. Схема, що ілюструє три основні підходи щодо синтезу розгалужених полімерних систем [4-7].

їх кількість, однак неможливо визначити їх довжину. Для формування активних центрів у цьому випадку опромінюють реакційну суміш, окисляють основний ланцюг, розкладають функціональні групи, попередньо введені в основний ланцюг. Введення функціональних груп дозволяє отримати більш контрольовану архітектуру полімеру. Як недолік, за опромінення часто спостерігають зшивання, або навпаки деструкцію макромолекул.

Окисно-відновна полімеризація передбачає взаємодію окисника (солі церію (Ce(IV))) з відновником (органічна сполука, яка містить гідроксильну або карбоксильну групу) з утворенням вільного радикалу, який ініціює полімеризацію. Використання цього підходу дозволяє мінімізувати побічні реакції та контролювати архітектуру одержаного полімеру [3].

Основними макромолекулярними характеристиками розгалуженого полімеру є середня молекулярна маса та полідисперсність, товщина шару прищепленого полімеру, густина щеплень та довжина однієї мономерної ланки [8].

Важливою особливістю розгалужених полімерних систем є можливість змінювати свою конформацію за дії зовнішніх факторів, зокрема температури або рН середовища. За впливу цих чинників молекулярні «щітки» (бічні функціональні групи) здатні котрольовано переходити від циліндричної до глобулярної конформації, що відкриває нові можливості їх практичного використання у біомедицині.

Декстран є нейтральним полімером і вважається першим прикладом мікробних екзополісахаридів, який активно використовують у біомедицині [9]. Його перевагами є те, що він водорозчинний, нетоксичний і розкладається в організмі людини без жодних побічних ефектів. Відтак, використання декстрану як основного ланцюга в процесі синтезу розгалужених полімерів є привабливим.

Зацікавленість до використання як прищеплень поліакриламід у аніонній формі (PAAan) та полі-N-ізопропілакриламід (PNIPAM) викликана тим, що перший полімер є рН-чутливим [10], а інший - термочутливим (для нього характерний структурний конформаційний перехід в області фізіологічних температур (32-37) °C [11,12]).

1.2. Розгалужені полімери як таргетні носії хіміопрепаратів

Зростання захворюваності та висока смертність зумовлюють актуальність розробки нових підходів щодо терапії злоякісних новоутворень. Так, за прогнозами науковців до 2040 року кількість смертей від раку перевищить 28 мільйонів людей [13]. Відтак, одним з перспективних наукових напрямків є пошук і створення нових ефективних систем для таргетної доставки протипухлинних препаратів.

Зауважимо, що до таких систем висувається низка вимог, зокрема [14,15]:

- біодоступність та фізико-хімічна стабільність у системах *in vitro* та *in vivo*;
- нетоксичність та неімуногенність;
- контрольоване вивільнення хіміопрепаратів у клітинах, тканинах або органах-мішенях;

- біодеградабельність або виведення з організму без жодних побічних ефектів.

Отже, націлювання протипухлинного препарату на певну патологічну ділянку не лише покращує ефективність його терапевтичної дії, але й зменшує токсичність, пов'язаної з хіміопрепаратом, оскільки дає можливість використовувати менші діючі дози.

Розрізняють два підходи щодо націлювання лікарських засобів [14,15]:

1) активне націлювання означає специфічну взаємодію ліганд-рецептор. Його основним механізмом є розпізнавання ліганду субстратом-мішенню;

2) пасивне націлювання базується на накопиченні препарату у ділянках навколо пухлин з «негерметичною» судинною тканиною. Цей ефект називають ефектом посиленого проникнення та утримання [16-19]. Він забезпечує накопичення лікарських засобів у пухлинних сайтах у високій концентрації завдяки патологічним відмінностям між нормальною і злоякісно-трансформованою тканинами. «Негерметична» судинна система пухлин здатна пропускати хіміопрепарати, що призводить до їх накопичення всередині. Цьому також сприяє поганий лімфодренаж, що означає: лікарські засоби, які проникають у пухлину через нещільні кровоносні судини, не виводяться так ефективно зі злоякісно-трансформованої тканини, як з нормальної [20,21].

Ефективними носіями протипухлинних препаратів можуть виступати полімери, які здатні їх інкапсулювати та завдяки ефекту посиленого проникнення та утримання селективно доставляти їх у пухлинний сайт [22]. Саме перехід полімерних архітектур від лінійних до більш складних розгалужених топологій відкриває нові можливості для покращення таргетної доставки хіміопрепаратів [23,24].

Розгалужені полімери – особливий клас полімерів, архітектура яких характеризується високою щільністю розгалужень [25]. Топологія розгалужених полімерів надає низку переваг порівняно з їх лінійними аналогами, зокрема висока функціональність поверхні та розчинність, низька внутрішня в'язкість, модифікуючі реологічні властивості тощо [22,25].

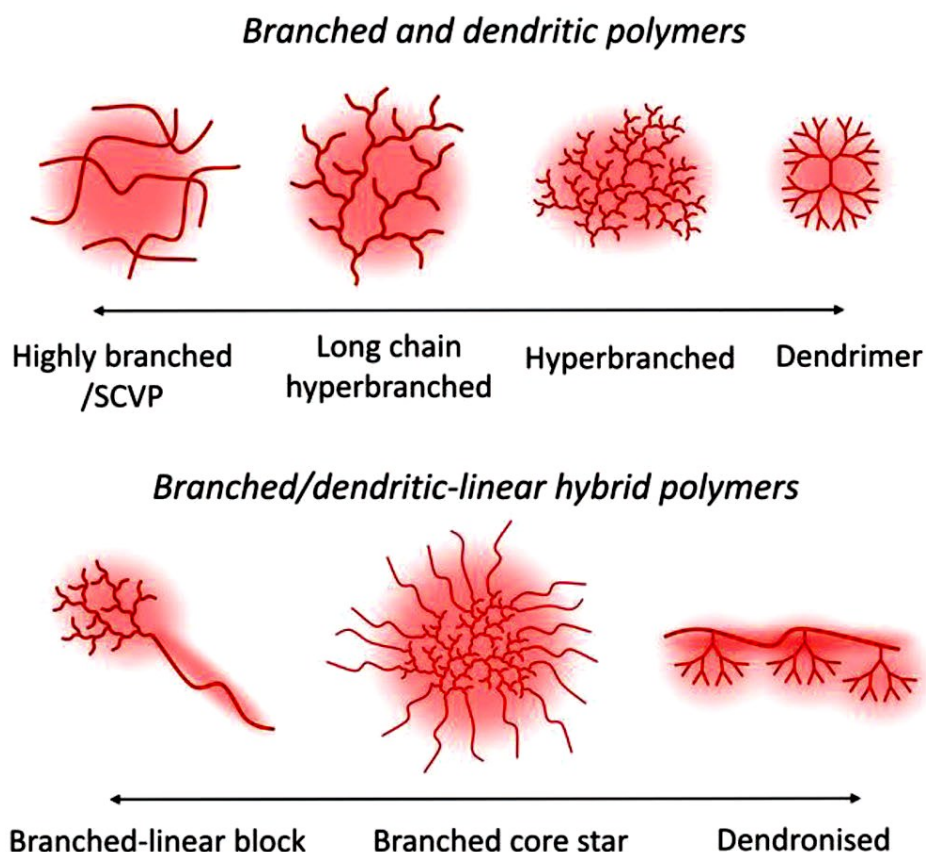


Рис. 1.2. Схематичне зображення розгалужених полімерних систем – потенційних таргетних носіїв лікарських засобів [22].

На рис. 1.2 показано розгалужені полімери різної архітектури, які наразі активно використовують як таргетні носії лікарських засобів [22].

Розгалужений полімер декстран-поліакриламід в аніонній формі (D-g-РААan), як слабкий поліелектроліт (частинки частково заряджені в розчині), сильно чутливий до рН середовища [26]. Відтак, можна припустити, що полімер D-g-РААan здатен утримувати молекули хіміопрепаратів у зв'язаному стані за нормального значення рН~7,2 і потім цілеспрямовано вивільняти їх у ділянку пухлини внаслідок зміни рН середовища (рН~5).

Зміна стану гідратації, що спричиняє об'ємний фазовий перехід, відображає конкуруючі властивості водневого зв'язку [10]. З точки зору термодинаміки це пояснюється балансом між ентропійними ефектами внаслідок самого процесу розчинення та впорядкованим станом молекул

води поблизу розгалуженого полімеру декстран–полі-N-ізопропілакриламід (D-g-PNIPAM). Ентальпічні ефекти обумовлені балансом між внутрішньомолекулярними та міжмолекулярними силами і сольватацією. Структурна перебудова цього полімеру супроводжується переходом від циліндра до глобули [27]. У цьому випадку полімер D-g-PNIPAM здатний вивільняти у зовнішнє середовище інкапсульовані за кімнатної температури лікарські препарати [28].

Зазначимо, що полімер D-g-PNIPAM демонструє конформаційний перехід за температури, яка майже не залежить від його концентрації у водному середовищі та молекулярної ваги [10]. Це важливо, оскільки при введенні в організм відбувається значне розведення розчину полімеру і зміна температури конформаційного переходу є небажаною. Водночас, підвищення температури конформаційного переходу полімеру можна досягти, наприклад, шляхом його полімеризації з гідрофільним мономером, який змістить гідрофільно-гідрофобний баланс до вищої гідрофільності і, таким чином, підвищить взаємодію D-g-PNIPAM з навколишніми молекулами води [28].

1.3 Використання хіміопрепаратів Cis і Dox в експериментальній онкології

Цисплатин (Cis) - водорозчинне неорганічне похідне двовалентної платини. У центрі молекули Cis міститься атом платини, що з'єднаний у *цис* конфігурації з двома відносно інертними аміногрупами та двома лабільними групами хлору (рис. 1.3).

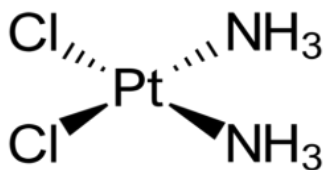


Рис. 1.3. Структура молекули Cis.

Cis є інертною молекулою, розчиняється у фізіологічному розчині та може накопичуватися у клітині [29], де гідролізується. Гідратоване похідне Cis є високоефективним електрофілом, що легко взаємодіє з різноманітними нуклеофільними групами нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) та молекулами мембранних фосфоліпідів, а також з усіма цистеїн-вмісними пептидами, зокрема відновленим глутатіоном (GSH) та металотіонами [30,31].

Наразі Cis активно використовують у клінічній практиці для лікування раку легень, молочної залози, шлунка, стравоходу, шийки матки, яєчників, сечового міхура, передміхурової залози, меланом, лімфом, нейробластоми тощо [32,33]. Водночас, незважаючи на високу ефективність платинових препаратів, Cis є токсичним хіміопрепаратом, який спричиняє побічні ефекти на організм хворих. Так, було виявлено Cis-індуковану нефротоксичність [34], нейротоксичність [35], кардіотоксичність [36], гепатотоксичність [37] і гематотоксичність [38], що зумовлено безпосереднім пошкодженням нейронів, міоцитів, гепатоцитів, епітеліальних клітин тощо. Крім того, побічні ефекти Cis терапії супроводжуються зниженням вироблення кістковим мозком клітин крові (мієлосупресія) та ослабленням імунітету організму (імуносупресія) [29,39].

Головною внутрішньоклітинною мішенню Cis є ДНК. За механізмом дії Cis подібний до алкілувальних агентів. Його цитотоксичний ефект пов'язують з утворенням внутрішньоланцюгових поперечних зшивок у ДНК [40]. Саме такі зшивки з меншою ефективністю піддаються дії репаруючих систем, перешкоджають транскрипції та блокують реплікацію [41]. Важливо також зазначити, що внаслідок утворення аддуктів Cis з мітохондріальною ДНК порушується функціонування дихального ланцюга мітохондрій та енергетичний обмін і, таким чином, активуються механізми клітинної загибелі [42].

Cis викликає вибіркове і стійке гальмування синтезу ДНК у пухлинних клітинах і, відповідно, їх поділу. Відомо, що пухлинні клітини є більш чутливими до дії хіміопрепаратів, аніж нормальні.

Cis викликає загибель клітин двома шляхами – через апоптоз (за низьких концентрацій, менше 100 мкМ) або некроз (за високих концентрацій, понад 100 мкМ).

Однак, незважаючи на широкий позитивний хіміотерапевтичний ефект Cis, його використання у лікуванні раку обмежується розвитком резистентності пухлинних клітин до хіміопрепарату, який відбувається за декількома механізмами: зменшення акумуляції Cis шляхом інгібування входу та активації його виходу; зниження токсичності Cis внаслідок дії внутрішньоклітинних тіолів; посилення роботи систем репарації ДНК; мутації сигнальних протеїнів [43,44].

Підсумовуючи, Cis характеризується широким спектром протипухлинної дії та високим терапевтичним індексом, однак його ефективність в онкотерапії є обмеженою внаслідок прояву побічної дії (нефро-, гепато-, кардіотоксичності тощо) та розвитку стійкості пухлинних клітин до хіміопрепарату. Cis є цитостатиком, що проявляє антипроліферативний ефект через ушкодження ДНК та утворення ДНК-платинових аддуктів. Проте, більша частина акумульованого пухлинними клітинами Cis діє на позаядерні мішені.

Припускають, що одним з підходів до підвищення терапевтичної ефективності Cis, зниження його негативних побічних ефектів, посилення цитотоксичності за нижчих концентрацій та подолання резистентності до хіміопрепарату є створення комбінованих систем, спрямованих на різні мішені та з різними механізмами дії. Відтак, їх складовими компонентами можуть виступати, наприклад, розгалужені полімери, як таргетні носії з метою посилення ефекту проникнення і накопичення хіміопрепарату у пухлинній тканині [45-48].

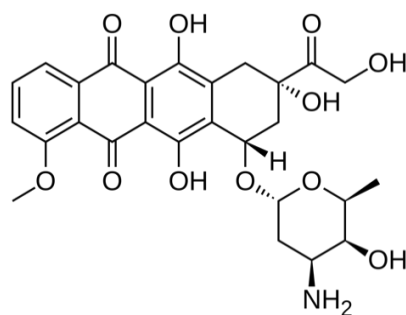


Рис. 1.4. Структура молекули Dox.

Доксорубіцин (Dox) – антрацикліновий антибіотик, який широко застосовують у терапії злоякісно-трансформованих пухлин (рис. 1.4). Його протипухлинна активність опосередкована інтеркаляцією у структуру ДНК, інгібуванням ДНК-топоізомерази II, що перешкоджає реплікації дволанцюгових розривів ДНК, а також запобіганням реплікації та синтезу білків [49]. Водночас, дозо-залежна кардіотоксичність Dox, яка проявляється у вигляді гострої, або ранньої чи пізньої прогресуючої кардіоміопатії, є значним негативним ефектом його застосування у клінічній практиці. Гостра серцева токсичність Dox виникає упродовж кількох днів після застосування хіміопрепарату і зустрічається приблизно в 11% пацієнтів: вона проявляється як оборотний міоперикардит, порушення функції лівого шлуночка або аритмії. Зазначимо, що аритмії виникають приблизно у 26% пацієнтів і можуть включати тахікардію, передчасні скорочення шлуночків і передсердь [50].

Встановлено, що у механізмах кардіотоксичності Dox задіяні процеси, які пов'язані з оксидативним стресом (утворення вільних радикалів, перекисне окислення ліпідів, мітохондріальна дисфункція, пошкодження ДНК, порушення сигналізування кальцію, активація каскадів проапоптотичних сигналів/гальмування сигналізації виживання) [51]. Оскільки серцева тканина залежить від оксидативного метаболізму, вона багата мітохондріями [52]. Відтак, потенційним чинником, що сприяє чутливості кардіоміоцитів до викликаних Dox пошкоджень, може бути висока спорідненість

хіміопрепарату до мітохондріального фосфоліпиду кардіоліпіну [53], локалізованого на внутрішній мембрані мітохондрій.

Передбачається, що використання біосумісних та біодоступних носіїв, зокрема розгалужених полімерів [54-58], дозволить знизити системну токсичність Dox та підвищити його протипухлинну ефективність.

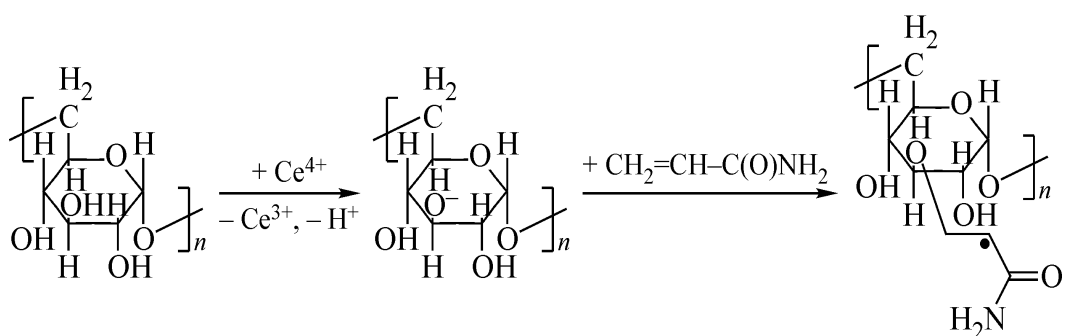
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали та фізико-хімічні методи їх дослідження

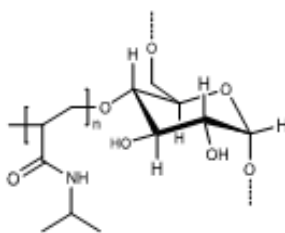
Dox і Cis (Sigma-Aldrich, Co, Ltd, США) розчиняли у фосфатно-сольовому буфері (PBS: 8,0 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,44 г Na₂HPO₄ і 0,24 г KH₂PO₄ в 1 л дистильованої води, pH=7,4) з максимальною концентрацією 40 і 500 μг/мл, відповідно.

Розгалужені полімери, D-g-РААan (pH-чутливий полімер) і декстран–полі-N-ізопропілакриламід (D-g-PNIPAM; термочутливий полімер), які використовували як носії для молекул Dox або Cis, були синтезовані методом вільнорадикальної полімеризації з використанням окисно-відновної системи Ce(IV)/HNO₃ [59-61].

РАА був прищеплений на декстран з молекулярною вагою M_w=70×10³ г/моль (Serva). PNIPAM був прищеплений на декстран з молекулярною вагою M_w=6×10³ г/моль (модифікація D6-g-PNIPAM) і молекулярною вагою M_w=70×10³ г/моль (модифікація D70-g-PNIPAM) (Merck). Хімічна реакція відбувається за такою схемою, наприклад, у випадку утворення сполуки D-g-РААan:



Хімічна структура сполуки D-g-PNIPAM має такий вигляд:



Молекулярні параметри синтезованих полімерів визначали за допомогою ексклюзійної хроматографії. Як елюент використовували 0,1 М розчин NaNO_3 . Методом потенціометричного титрування визначали вміст карбоксильних груп у складі одержаної макромолекули полімеру. Встановлено, що молекулярна вага полімеру D-g-PAAan складала $M_w=2,15 \times 10^6$ г/моль. Молекулярна вага полімеру D70-g-PNIPAM, використаного у дослідженні, становила $M_w=1,03 \times 10^6$ г/моль, а D6-g-PNIPAM - $M_w=0,674 \times 10^6$ г/моль.

Усі зразки полімерів осаджували у надлишку ацетону, розчиняли у бідистильованій воді, потім ліофілізували та зберігали у вакуумі для запобігання їх додатковому гідролізу.

Вихідна концентрація водних розчинів полімерів D-g-PAAan та D-g-PNIPAM була 1000 $\mu\text{г/мл}$.

Полімер D-g-PAAan і Dox або Cis змішували у відповідних об'ємних співвідношеннях для отримання водорозчинних D-g-PAAan+Dox (500+40, 125+5, 62,5+2,5 і 25+1 $\mu\text{г/мл}$) або D-g-PAAan+Cis (500+250, 40+20, 20+10 і 10+5 $\mu\text{г/мл}$) зразків, відповідно. Полімер D-g-PNIPAM та Dox змішували у таких об'ємних співвідношеннях для отримання водорозчинних D-g-PNIPAM+Dox зразків: 500+40, 125+5, 62,5+2,5 та 25+1 $\mu\text{г/мл}$. Полімер D-g-PNIPAM та Cis змішували у такому об'ємному співвідношенні для отримання водорозчинного D-g-PNIPAM+Cis зразка: 500+250 $\mu\text{г/мл}$. Усі маніпуляції проводили за кімнатної температури.

Для дослідження взаємодії полімерів D-g-PAAan з молекулами Dox або Cis, а також D-g-PNIPAM з молекулами Dox використовували інфрачервону спектроскопію з перетворенням Фур'є (FTIR). Спектри FTIR визначали на спектрофотометрі Nicolet NEXUS-475 (США) у діапазоні довжин хвиль $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ з використанням тонких плівок товщиною 6–9 $\mu\text{м}$. Плівки одержували з водних розчинів полімерів D-g-PAAan з Dox або Cis, D-g-PNIPAM з Dox, а також без їх додавання.

Розподіл за розміром частинок, значення індексу полідисперсності (PDI) і дзета-потенціалу для досліджуваних водних систем визначали методом динамічного розсіювання світла (DLS) на Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK) за кімнатної температури. Прилад був оснащений He-Ne лазером (потужність 5 мВт), що працює на довжині хвилі 633 нм. Автокореляційну функцію інтенсивності розсіяного світла аналізували за допомогою програмного забезпечення Malvern Zetasizer.

Термограми полімерів D-g-PNIPAM у водному розчині записували за використання мікрокалориметра SETARAM III (Франція). Вимірювальну кювету заповнювали розчином D-g-PNIPAM (200 мг). Еталонну кювету заповнювали дистильованою водою до тієї ж ваги, що й перша кювета, з точністю до 0,1 мг.

2.2. Лінії нормальних і пухлинних клітин та умови їх культивування

У дослідженнях було використано лінію нормальних клітин - фібробласти легень людини HEL299, модельну клітинну лінію HEK293 (штучно отримана з нирки ембріону людини), а також лінії пухлинних клітин - трансформовані епітеліальні клітини HeLa шийки матки людини, клітини MC3T3 остеобластів миші, клітини карциноми легені A549 людини і LLC миші та їх резистентна лінія до доксорубіцину LLC/DoxR.

Адгезивні (моношарові) клітини культивували у середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, Sigma, США) за присутності 10% ембріональної телячої сироватки (ETC), 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 μг/мл стрептоміцину в зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37 °C. Клітини пересівали через кожні 72 год розведенням клітин у культуральному середовищі у співвідношенні 1:5 [62]. Обробку трипсином (1:10 у PBS) використовували для субстрат-залежних клітин.

Клітинні лінії були отримані з колекції клітинного банку тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та

радіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України та німецької колекції мікроорганізмів і клітинних культур Інституту м. Лейбніца (DSMZ) (ФРН).

2.3. Оцінка життєздатності клітин за використання МТТ-тесту

Життєздатність клітин оцінювали за швидкістю відновлення МТТ (3-[4, 5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід). Метод базується на здатності дегідрогеназ дихального ланцюга мітохондрій перетворювати МТТ на формазан [63]. МТТ-тест проводили у 96-лункових планшетах (GreinerBioOne, ФРН) за концентрації клітин у лунці $5-10 \times 10^3$ у 100 μ л. У кожен лунку вносили по 10 μ л розчину МТТ та інкубували упродовж 2 год при 37 °С, після чого планшети центрифугували (600 g, 7 хв) та відбирали надосад. Осад зберігали за температури 4 °С у темряві упродовж 20 год. До отриманого осаду формазану додавали 100 μ л концентрованого розчину диметилсульфоксиду. Через 15 хв проводили вимірювання екстинції на спектрофотометрі (μ Quant, БіоТЕК, США) при $\lambda=570$ нм. Життєздатність клітин виражали у відсотках відносно контролю.

Розрахунок показника IC₅₀ проводили за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Індивідуальні криві концентраційних залежностей були побудовані шляхом визначення логарифму концентрацій досліджуваних сполук порівняно з відповідним нормалізованим відсотком значень життєздатності клітин з використанням нелінійної регресії.

2.4. Аналіз живі/мертві клітини

Аналіз живі/мертві клітини проводили за використання набору live/dead viability/cytotoxicity assay for mammalian cells (L3224, Invitrogen Co.) згідно протоколів виробника. Клітини після інкубації промивали розчином фосфатного буфера і фарбували робочим розчином, який містив кальцеїн АМ і гомодимер етидію-1 (EthD-1). Після цього клітини інкубували упродовж 30 хв при 37 °С. Цей метод визначає життєздатність клітин на основі цілісності

клітинної мембрани. Живі клітини забарвлюються кальцеїном АМ, який випромінює світло довжиною хвилі 517 нм (зелена флуоресценція) при збудженні синім світлом (494 нм), тоді як мертві клітини забарвлюються EthD-1, який випромінює світло довжиною хвилі 617 нм (червона флуоресценція) при збудженні зеленим світлом (528 нм).

Аналіз живі/мертві клітини за їх життєздатністю проводили за використання флуоресцентного мікроскопу Keyence Biorevo BZ-9000 (Осака, Японія), оснащеного фільтрами для FITC (флуоресцеїн 5-ізотіоціанат) та TRITC (тетраметилродамін 5-ізотіоціанат хлорид) з об'єктивами кратності збільшення $\times 10$ і $\times 20$. Усі зображення було збережено і оброблено за допомогою програмного забезпечення BZ-II.

2.5. Конфокальна мікроскопія

Клітини після інкубації тричі промивали розчином фосфатного буфера і фіксували 4% параформальдегідом за кімнатної температури упродовж 10 хв, потім фарбували флуоресцентним барвником DAPI (4',6-діамідин-2-феніліндол) з афінністю до клітинного ядра і тричі промивали розчином фосфатного буфера.

Проникнення та внутрішньоклітинну локалізацію частинок вивчали за допомогою конфокальної мікроскопії (аналіз Z-стеків) з використанням системи TCS SP8 AOBS і програмного забезпечення LASX (Leica Microsystems). Для збудження використовували лазерні лінії DPSS 561 нм (для Dox) і діод 405 нм (для барвника DAPI). Зображення було отримано з об'єктивом кратності збільшення $\times 20$.

2.6. Оцінка вивільнення хіміопрепаратів Cis і Dox з полімеру

Частинки полімеру окремо або у складі з хіміопрепаратом в об'ємі 1000 μ л додавали у діалізний мішок (MWCO 1 кДа, Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Карлсруе, ФРН)). Діалізну систему суспендували в об'ємі 100 мл буфера при 37 °C і центрифугували зі

швидкістю 200 об/хв (розведення 1:100 між донорським і акцепторним компартментом). Через визначені часові проміжки відбирали по 500 μ л середовища і оцінювали вивільнення хіміопрепарату за використання поєднаного методу високоефективної рідинної хроматографії (ВРХ) та мас-спектрометрії (HPLC-ESI-MS/MS).

Одразу додавали такий же об'єм (500 μ л) свіжого буфера за тієї ж температури, щоб підтримувати постійний об'єм середовища. Ацетатний і фосфатний (PBS) буфери використовували для рН середовища 5,0 і 7,4, відповідно. Отримані дані нормалізували за допомогою буферного контролю та виражали у % від відповідного контрольного зразка, проаналізованого через 0 годин (одразу). Концентрацію вивільненого Dox оцінювали за допомогою HPLC-ESI-MS/MS-аналізу [64], тоді як кількісне визначення вивільненого Cis вимагало створення нової методики, описаної нижче (табл. 2.1).

Елюювання та розділення Cis проводили на колонці Eclipse XDB-C18 (4,6 $\times$ 100 мм) з розміром частинок 3 μ м за ізократичних умов з рухомою фазою метанолу та 0,1% водного розчину мурашиної кислоти. Швидкість потоку дорівнювала 0,5 мл/хв. Унікальні умови хроматографічної оберненої фази та оптимізовані параметри MS/MS представлені у табл. 2.1.

Аналіз HPLC-ESI-MS/MS проводили з використанням режиму моніторингу множинних реакцій, який забезпечує найкращу чутливість і точність вимірювань.

Стандарти Cis-калібрування від 0,1 до 50 μ г/мл готували з 250 μ г/мл основного водного розчину. Ці стандарти зберігали у темряві за температури 4 °С. Кількісну оцінку було досягнуто в рамках проведеного регресійного аналізу. Отримані дані були нормалізовані за допомогою буферних контролів і виражені у відсотках від відповідного контрольного зразка.

Таблиця 2.1. Умови HPLC-ESI-MS/MS для аналізу вивільнення Cis.

<i>Умови хроматографії</i>	
Колонка, її температура	MN NucleodorEC100/3 C18, 40°C
Рухома фаза	Метанол: 0,1% мурашина кислота H ₂ O
Швидкість потоку	0,5 мл/хв
Тривалість	1,7 хв
Об'єм ін'єкції	3 μ л
<i>Умови мас-спектрометрії</i>	
Температурні лінії десольватації	250 °C
Температура термоблоку	400 °C
Таргентний молекулярний іон	332,9 [M ⁺ Na] ⁺ m/z
Іони продукту	305,9, 23,05 m/z
Часове вікно	0-1,7 хв
Час витримки	0,2 с
Напруга інтерфейсу	4,5 кВ
Потік розпилюючого газу	3 л/хв
Потік сушильного газу	15 л/хв

2.7. Оцінка вмісту АФК у клітинах

Внутрішньоклітинне продукування активних форм кисню (АФК) оцінювали за допомогою зонда 2,7-дихлордигідрофлуоресцеїну діацетату (DCFH-DA; Sigma-Aldrich Co., St-Луїс, США), який вносили до середовища інкубації клітин (2×10^6 /мл) до кінцевої 5 μ M концентрації у пробі [65]. Інтенсивність флуоресценції зонда реєстрували упродовж 45 хв на рідері для мікропланшетів Tecan Infinite M200 Pro (Männedorf, Швейцарія).

2.8. Оцінка рівня АТФ у клітинах

Внутрішньоклітинний вміст АТФ визначали за використання набору Promega Mitochondrial ToxGlo assay kit (Медисон, Вісконсин, США) згідно протоколів виробника. Клітини (10^4) після 24 год інкубації з досліджуваними сполуками витримували упродовж 10 хв за кімнатної температури. До кожної лунки вносили по 50 μ л реагенту, який містив люциферин, інгібітори АТФази та термостабільну люциферазу. Після струшування проб при 600

об/хв упродовж 1 хв вимірювали інтенсивність люмінесценції на мікропланшетному рідері Tecan Infinite M200 Pro (Männedorf, Швейцарія).

2.9. Оцінка активності каспази 3/7 у клітинах

Активність каспази 3/7 визначали за використання набору Promega Caspase-Glo® 3/7 Activity assay kit (Madison, США) згідно протоколів виробника. Клітини ($0,3 \times 10^4$) після 24 год інкубації з досліджуваними сполуками витримували упродовж 10 хв за кімнатної температури. Додавали однаковий об'єм реагенту Caspase-Glo 3/7 і суміш обережно перемішували на шейкері для плашок (300 об/хв) упродовж 1 хв. Зразки інкубували за кімнатної температури упродовж 1 год. Люмінесценцію зразків реєстрували на мікропланшетному рідері Tecan Infinite M200 Pro (Männedorf, Швейцарія).

2.10. Формування та оцінка життєздатності 3D сфероїдів у культурі клітин

Сфероїди клітин LLC формували у 96-лункових планшетах Corning® ultra-low з U-подібним (круглим) дном. Для цього клітини LLC (10^4 клітин на лунку) висівали у безсироваткове середовище DMEM, декілька секунд центрифугували та інкубували у CO₂ - інкубаторі за температури 37 °C, 5% CO₂ і 95% вологості.

Після утворення сфероїдів (через 24 год після посіву клітин) додавали досліджувані сполуки і через 24 год оцінювали життєздатність 3D клітин за використання набору Promega CellTiter-Glo® 3D 3D Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) згідно протоколу виробника. Планшет з клітинами діставали із CO₂ - інкубатора та упродовж 30 хв охолоджували до кімнатної температури. Додавали однаковий об'єм реагенту CellTiter-Glo® 3D, який містив люміногенний пептидний субстрат, далі обережно перемішували на шейкері для плашок при 300 об/хв упродовж 5 хв. Далі плашку інкубували за кімнатної температури упродовж 25 хв для стабілізації люмінесцентного

сигналу. Інтенсивність люмінесценції продуктів вимірювали за допомогою мікропланшетного рідера Tecan Infinite M200 Pro (Männedorf, Швейцарія).

2.11. Флуоресцентна мікроскопія

Після утворення сфероїдів (через 24 год після посіву клітин) додавали досліджувані сполуки та інкубували упродовж 7 год. Після цього 3D сфероїди клітин LLC візуалізували за допомогою флуоресцентного мікроскопу Keyence BZ-9000 BIOREVO (Осака, Японія), оснащеного червоним ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ нм}$) фільтром і відповідним програмним забезпеченням для отримання даних Keyence BZ- II Viewer (Осака, Японія). Накладені зображення були оброблені за допомогою програмного забезпечення Keyence BZ-II Analyzer Software (Осака, Японія).

2.12. Статистична обробка даних

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, зокрема за допомогою t-тесту (OriginLab Corporation, USA), одно- та двофакторного дисперсійного аналізу (one-/two-way ANOVA) з Tukey *post-hoc* тестом. Відмінність показників при значеннях $p \leq 0,05$ вважали статистично значущою [66]. Досліди проводили як мінімум у трьох паралелях у кожному з варіантів. Побудову графіків та обробку даних здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2010 та GraphPad Prism 7. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного значення та середньоквадратичного відхилення ($M \pm SD$).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Структурна організація комплексів полімерів D-g-PAAn і D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis у водному середовищі

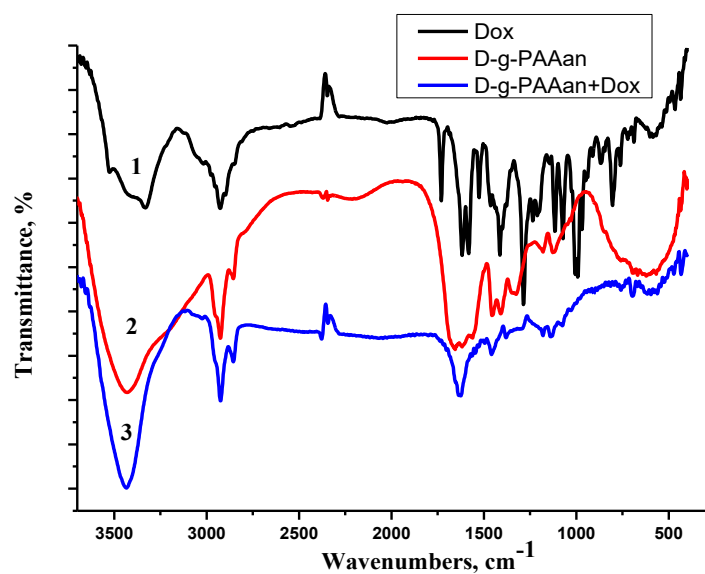
3.1.1. Комплекси полімеру D-g-PAAn з хіміопрепаратами Dox і Cis

Створені водорозчинні комплекси полімеру D-g-PAAn з молекулами Dox або Cis було охарактеризовано за допомогою FTIR методу.

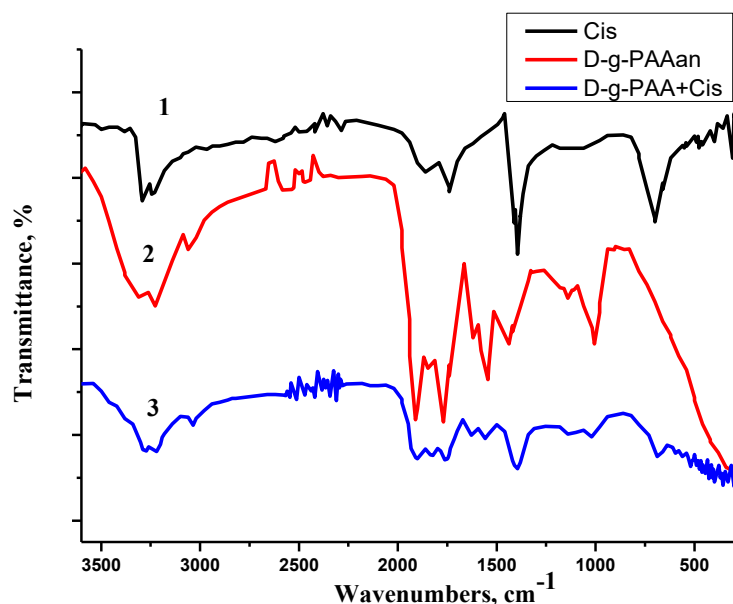
Спектри FTIR D-g-PAAn, а також D-g-PAAn+Dox і D-g-PAAn+Cis у порівнянні зі спектром Dox і Cis показані на рис. 3.1А і рис. 3.1В, відповідно. При порівнянні цих спектрів бачимо спектральні зміни як в ІЧ смугах полімеру, так і Cis смугах в околі 782, 1290, 2848 і 3271 cm^{-1} (рис. 3.1В). FTIR спектри Dox і Cis подібні до отриманих у роботах [67,68] (рис. 3.1). Широка смуга з центром 3500 cm^{-1} спостерігається для усіх зразків.

Спектри FTIR зразків D-g-PAAn і D-g-PAAn+Cis, які мають дві інтенсивні смуги (1650-1660) cm^{-1} і 1615 cm^{-1} , спричинені Амідом І (розтягування) і Амідом ІІ (вигин N-H зв'язку) [69] (рис. 3.1В). Спектри продукту реакції Cis і Dox з D-g-PAAn виявили різкі зміни інтенсивності поглинання в межах смуг Амід І і Амід ІІ, а також для смуги з піком 1570 cm^{-1} (COO-, розтягування) [70] (рис. 3.1), що свідчить про комплексоутворення Cis і Dox з карбоксильними групами полімеру.

Отримані водні системи були охарактеризовані методом DLS, оскільки розмір частинок корелює з їх токсичністю, мембранотропною та протиопухлинною активністю у системах *in vitro* та *in vivo* [71-75].



A



B

Рис. 3.1. FTIR спектри для різних систем: (A) 1 – Dox; 2 - D-g-PAAan і 3 - D-g-PAAan+Dox; (B) 1 – Cis; 2 - D-g-PAAan і 3 - D-g-PAAan+Cis.

У табл. 3.1 представлено гідродинамічний розподіл частинок за розмірами у різних водних розчинах за кімнатної температури. Так, водна система D-g-PAAan містить наночастинки з гідродинамічним діаметром 101 нм. Суміші D-g-PAAan+Dox і D-g-PAAan+Cis утворювали частинки з

гідродинамічним діаметром 250 і 198 нм, відповідно. Індекс полідисперсності (PDI), як показник агрегації частинок у водному середовищі, для досліджуваних зразків знаходився в межах 0,2-0,4. Це свідчить про помірну дисперсність цих водних систем. Дзета-потенціал пов'язаний зі стабільністю колоїдних дисперсій. За кімнатної температури значення дзета-потенціалу для водних систем D-g-PAAan, D-g-PAAan+Dox і D-g-PAAan+Cis становило від -20 до -27 мВ. Великий негативний заряд окремих частинок (або, точніше, електростатичне відштовхування між негативно зарядженими агрегатами) свідчить про стабільність досліджуваних водних систем з часом.

Таблиця 3.1. Гідродинамічний діаметр частинок (Z-середній розмір), значення індексу PDI і дзета-потенціалу для різних водних систем за кімнатної температури.

Зразок	Діаметр, нм	PDI	Дзета-потенціал, мВ
D-g-PAAan (125 μг/мл)	101	0.21	-20
D-g-PAAan+Dox (125+5 μг/мл)	250	0.39	-27
D-g-PAAan+Cis (40+20 μг/мл)	198	0.28	-22

Дані DLS щодо гідродинамічного розподілу діаметрів водних систем частинок D-g-PAAan (500 μг/мл) вказують на їхній розмір до 120 нм з індексом PDI 0,185 (рис. 3.2). Після того як полімерні частинки інкапсулювали у протипухлинні препарати, спостерігали зменшення цього параметру, зокрема встановлено, що розмір полімерних наночастинок, навантажених Dox і Cis, становить близько 80 нм (рис. 3.2). Цей факт пояснюється тим, що функціональні групи полімеру частково зв'язані з

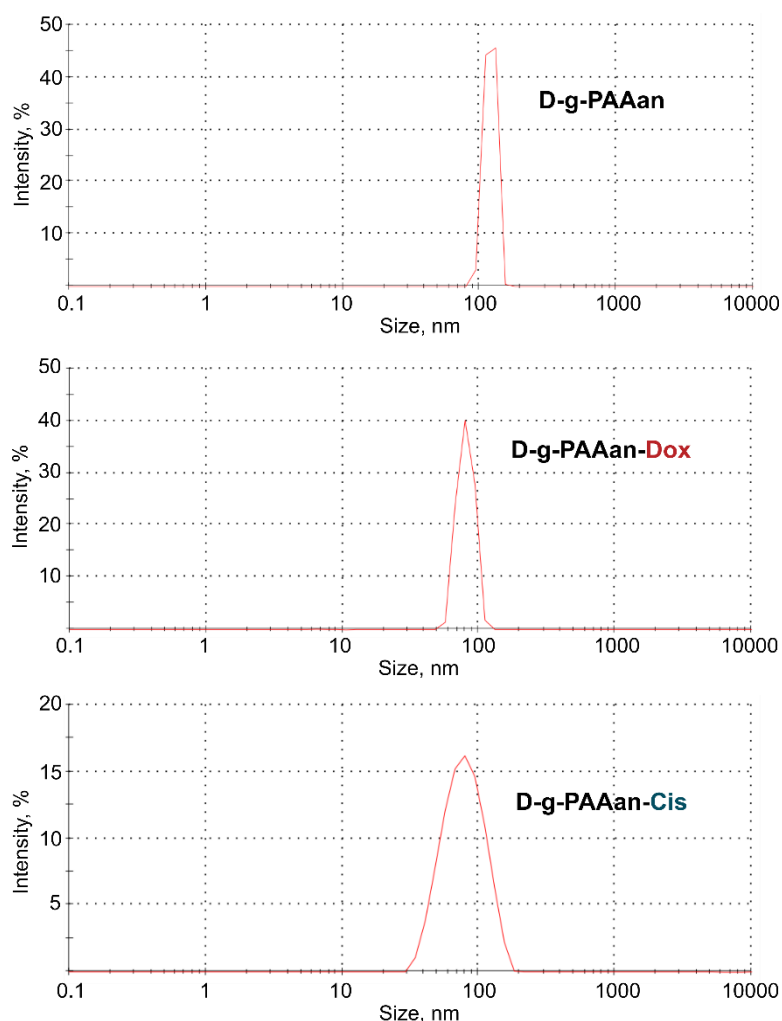


Рис. 3.2. Гідродинамічний розмір (діаметр, нм) вільних, Dox- та Cis-навантажених частинок D-g-PAAan (500 $\mu\text{г/мл}$). Інтенси́вність у % до інтенсивності усього розсіяного світла.

молекулами Dox або Cis, що призводить до екранування негативного заряду у прищеплених ланцюгах і до усадки D-g-PAAan структури загалом.

Значення індексу PDI для Dox- і Cis-навантажених наночастинок D-g-PAAan було оцінено на рівні 0,206 і 0,244, відповідно, що свідчить про монодисперсний розподіл їх розмірів.

Значення дзета-потенціалу для вільного D-g-PAAan, а також водних систем D-g-PAAan-Dox (500+40 $\mu\text{г/мл}$) і D-g-PAAan-Cis (500+250 $\mu\text{г/мл}$) становило -21,4, -28,6 і -23,8 мВ, відповідно. Це вказує на низьку тенденцію їх агрегування з часом у водному розчині (тобто високу стабілізацію розчиненої речовини). Розподіл за розміром і дзета-потенціал водних систем

D-g-PAAan, D-g-PAAan-Dox і D-g-PAAan-Cis практично не змінювалися упродовж 6 місяців.

Для оцінки стабільності у клітинній культурі вільний D-g-PAAan, D-g-PAAan-Dox і D-g-PAAan-Cis інкубували при 37 °C упродовж 48 год у DMEM з додаванням 1% FBS, що імітує клітинне середовище. Через 0, 24 та 48 год розподіл гідродинамічного діаметра вимірювали за допомогою DLS (табл. 3.2). Таким чином, розподіл частинок вільного D-g-PAAan за розміром становив близько 130 нм. На нашу думку, збільшення на 10 нм розподілу розміру частинок вільного D-g-PAAan свідчить про утворення білкової корони на поверхні частинок у середовищі DMEM, доповненому FBS. Розподіл розміру частинок D-g-PAAan-Dox і D-g-PAAan-Cis становив приблизно 150 нм. Відомо, що структурна організація частинок, поверхня яких заряджена, визначається не лише гідрофобною та Ван-дер-Ваальсовою взаємодіями, але й електростатичною взаємодією, а тому істотно залежить від наявності електролітів у середовищі розчинення [76]. І D-g-PAAan у водному розчині, і бичачий сироватковий альбумін (BSA), основний компонент FBS, мають невеликі негативні значення дзета-потенціалу. Однак багатозарядні катіони у середовищі DMEM (Ca^{2+} , Fe^{3+} і Mg^{2+}) здатні внутрішньо перехресно зв'язувати ланцюги PAA шляхом взаємодії із COO^- групами та значно знижувати дзета-потенціал вихідного D-g-PAAan. Внаслідок цього D-g-PAAan може взаємодіяти з BSA та утворювати агрегати [77].

3.1.2. Комплекси полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis

Ділянку фазового переходу термочутливих полімерних носіїв D-g-PNIPAM контролювали методом диференціальної скануючої калориметрії (DSC). Рис. 3.3 показує, що екзотермічний фазовий перехід починається десь біля 34 °C і повністю завершується за температури 37 °C.

Таблиця 3.2. Гідродинамічний діаметр (нм) вільного, навантаженого Dox та Cis D-g-PAAan у середовищі DMEM з 1% FBS.

Час	0	24 год	48 год
D-g-PAAan (500 $\mu\text{г/мл}$)	130	132	131
D-g-PAAan+Dox (500+40 $\mu\text{г/мл}$)	151	154	156
D-g-PAAan+Cis (500+250 $\mu\text{г/мл}$)	149	147	148

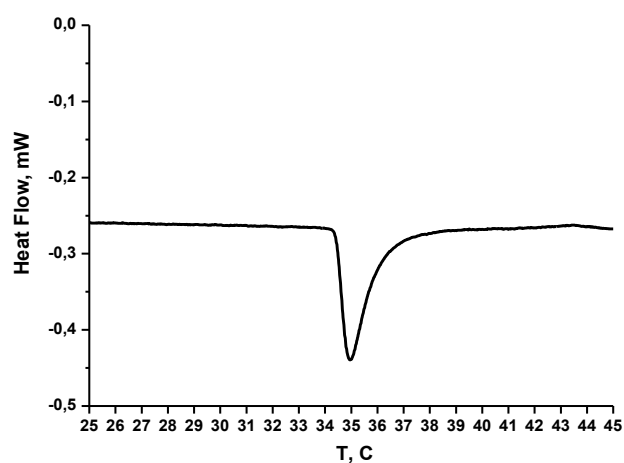


Рис. 3.3. DSC термограма для D-g-PNIPAM (модифікація D70-g-PNIPAM) у водному розчині (125 $\mu\text{г/мл}$).

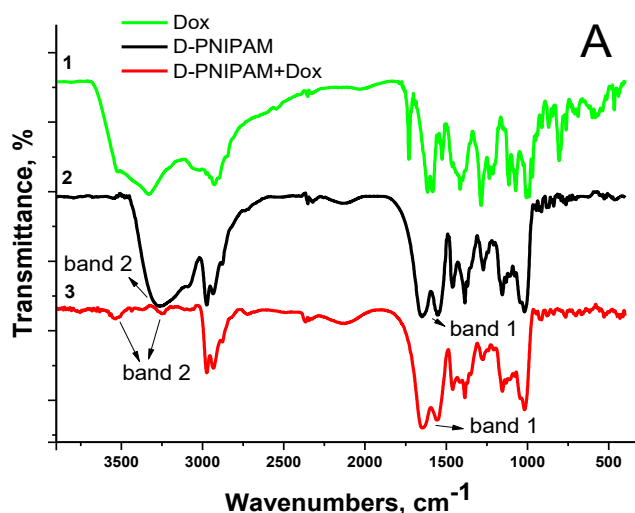


Рис. 3.4. FTIR спектри: 1 – Dox (5 $\mu\text{г/мл}$) (A); 2 – D-g-PNIPAM (модифікація D70-g-PNIPAM) (125 $\mu\text{г/мл}$) і 3 – D70-g-PNIPAM+Dox (125+5 $\mu\text{г/мл}$) комплекс.

Спектри FTIR для D-g-PNIPAM, D-g-PNIPAM+Dox, а також Dox показані на рис. 3.4. У спектрі D-g-PNIPAM ($1650\text{--}1660\text{ см}^{-1}$, C=O) та Амиду II (1615 см^{-1} , N-H) чітко виражені характерні смуги Амиду I (смуга 1). Спектр FTIR для Dox був подібний до отриманого в роботі [78]. Для усіх зразків спостерігали широку смугу в околі 3500 см^{-1} . Оскільки полімер є гідрофільним, він утримує до 10% води навіть після висушування. При утворенні комплексів D-g-PNIPAM+Dox гідрофільні функціональні групи макромолекул зв'язують молекули Dox, що змінює гідрофільність системи і, таким чином, пояснює відмінність у смугах полімеру чи комплексу у діапазоні $3500\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ (смуга 2). Ці смуги є накладанням широкої смуги коливань водневих груп -OH. Для системи D-g-PNIPAM+Dox спостерігали зникнення смуги поглинання при 1730 см^{-1} , що відповідає C=O коливанням. Також зареєстровано деякі зміни у характеристичних смугах Амід I та Амід II порівняно з окремим полімером D-g-PNIPAM. Ці зміни були більш вираженими для NH_2 груп у комплексі D-g-PNIPAM+Dox. Таким чином, дослідження FTIR засвідчило взаємодію між полімером і молекулами Dox.

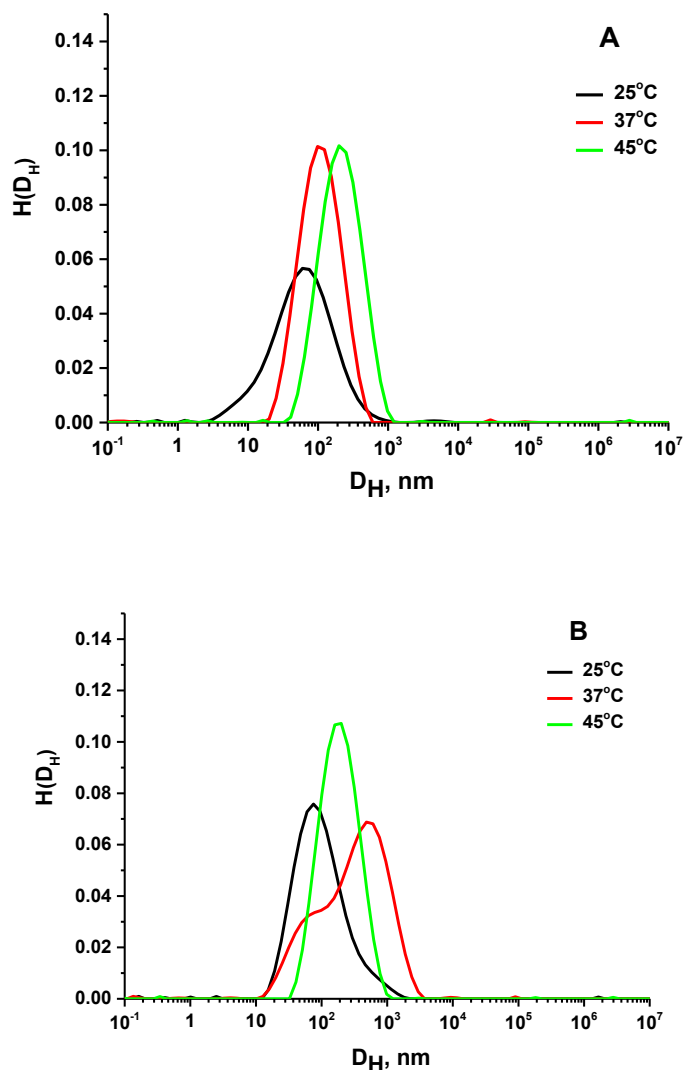


Рис. 3.5. Гідродинамічний діаметр розподілу для D-g-PNIPAM (модифікація D70-g-PNIPAM) (A) і D70-g-PNIPAM+Dox (B) систем за різних температур.

На рис. 3.5A і в табл. 3.3 показано зміну розміру розсіювальних об'єктів для D-g-PNIPAM за різни температур. Як бачимо, при 25 °C макромолекули D-g-PNIPAM мають розмір близько 60 нм. При 37 і 45 °C розмір розсіювальних об'єктів D-g-PNIPAM збільшився до 110 і 220 нм, відповідно, і обидва піки стали вузькими порівняно з піком при 25 °C. На рис. 3.5B показано поведінку системи D-g-PNIPAM+Dox при 25, 37 і 45 °C. Видно, що при 25 °C розмір розсіювальних об'єктів був трохи більшим порівняно з полімером D-g-PNIPAM (табл. 3.3). У водному розчині

макромолекули D-g-PNIPAM зазнають агрегації, коли температура підвищується від 25 до 37 °C (рис. 3.5B). Слід зазначити, що для системи D-

Таблиця 3.3. Гідродинамічний діаметр частинок та значення індексу PDI для D-g-PNIPAM (модифікація D70-g-PNIPAM) та D70-g-PNIPAM+Dox водних систем за різних температур.

Система	D_h (25 °C), нм	PDI (25 °C)	D_h (37 °C), нм	PDI (37 °C)	D_h (45 °C), нм	PDI (45 °C)
D70-g-PNIPAM (125 µг/мл)	60	0.75	110	0.52	220	0.56
D70-g-PNIPAM+Dox (125+5 µг/мл)	76	0.62	81 (додатковий пік при 515)	0.74	185	0.54

g-PNIPAM+Dox спостерігали два піки розподілу за розміром частинок при 37 °C. Цей факт свідчить про початок процесу агрегації. Подальше підвищення температури до 45 °C призводило до припинення утворення агрегатів (табл. 3.3). Нарешті, розподіл частинок за розміром також можна отримати зі значення індексу PDI [79]. Зареєстровані значення $PDI > 0,5$ свідчать про високо полідисперсний розподіл досліджуваних зразків (табл. 3.3).

На першому етапі взаємодію у системі D-g-PNIPAM-хіміотерапевтичний препарат (Dox або Cis) досліджували методом FTIR-спектроскопії. Інкапсуляцію хіміотерапевтичних препаратів у полімер-носії підтверджено зміною характеристичних смуг полімеру, а саме на ділянці Аміду I ($1650\text{--}1660\text{ см}^{-1}$, C=O) та Аміду II (1615 см^{-1} , N-H). Зазначимо, що спектри FTIR були однаковими для синтезованих полімерних носіїв двох різних модифікацій (D70-g-PNIPAM і D6-g-PNIPAM).

На рис. 3.6, 3.7 наведено спектри зразків на основі D70-g-PNIPAM. Спектри FTIR для усіх досліджуваних систем демонструють широку смугу

при 3500 см^{-1} . Оскільки полімер гідрофільний, то навіть у висушеному вигляді він утримує до 10% води. Це може бути причиною того, чому смуги полімеру або його комплексу з протипухлинними препаратами на ділянці $3500\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ демонструють незначну відмінність (існує перекриття широкої смуги коливань ОН-груп води). Для системи D70-g-PNIPAM+Dox (рис. 3.6) спостерігається відсутність смуг поглинання групи N-H полімеру (3310 см^{-1}) і групи C=O Dox (1730 см^{-1}). Це свідчить про утворення комплексу переважно завдяки взаємодії з аміногрупами.

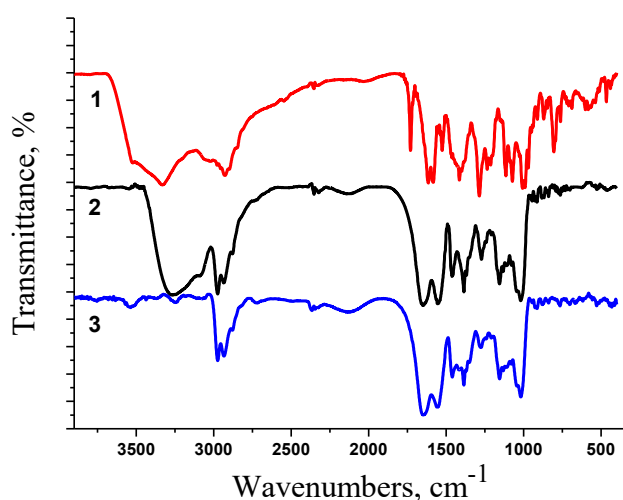


Рис. 3.6. Спектри FTIR для: 1 – Dox (40 $\mu\text{г/мл}$); 2 – D70-g-PNIPAM (500 $\mu\text{г/мл}$) і 3 – D70-g-PNIPAM+ Dox (500 + 40 $\mu\text{г/мл}$) комплексу.

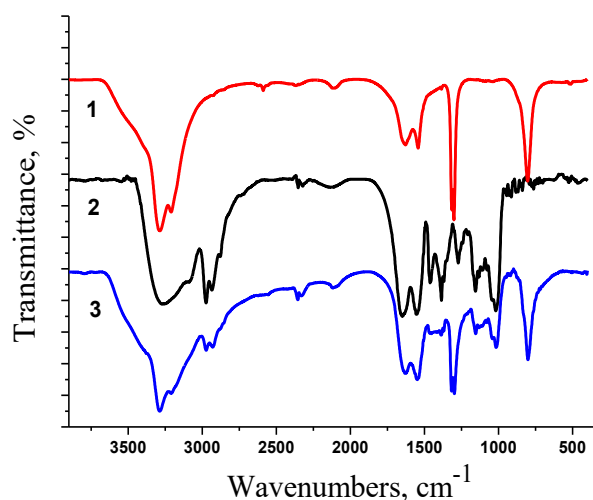


Рис. 3.7. Спектри FTIR для: 1 – Cis (250 $\mu\text{г/мл}$); 2 – D70-g-PNIPAM (500 $\mu\text{г/мл}$) і 3 – D70-g-PNIPAM+Cis (500 + 250 $\mu\text{г/мл}$).

FTIR спектр системи D70-g-PNIPAM+Cis наведено на рис. 3.7. Має місце зміна інтенсивності смуг Амиду I та Амиду II, а також коливань зв'язку C-H (2980, 2920, 1460, 1380, 1145 і 1030 cm^{-1}).

Таким чином, спектральні зміни для досліджуваних систем D70-g-PNIPAM+Dox і D70-g-PNIPAM+Cis порівняно з їхніми складовими компонентами свідчать про ймовірне утворення комплексів.

На наступному етапі методом DLS оцінювали розмір частинок і процес їх агрегації у водній системі (рис. 3.8). Вільні полімери D70-g-PNIPAM і D6-g-PNIPAM мали піки інтенсивності за гідродинамічних радіусів 40 і 30 нм, відповідно, що визначаються їх різними молекулярними масами. Для наночастинок Dox і Cis одержали 21 і 82 нм, відповідно (рис. 3.8A).

Комплекси D70-g-PNIPAM+Dox і D6-g-PNIPAM+Dox мали піки інтенсивності за гідродинамічних радіусів 67 і 27 нм, відповідно (рис. 3.8B). Збільшення розміру наночастинок у випадку D70-g-PNIPAM+Dox пов'язано, ймовірно, з гідрофобними взаємодіями між ланцюгами PNIPAM і Dox, які викликали часткову агрегацію комплексу. Водночас, значення R_{Hmax} для D6-g-PNIPAM+Dox зменшилося, ймовірно, завдяки стисненню цієї макромолекули. Cis не виявляв значного впливу на значення R_{Hmax} розподілу наночастинок за розміром D70-g-PNIPAM+Cis і D6-g-PNIPAM+Cis порівняно з вільними полімерами (рис. 3.8C).

Відмінність у структурній організації комплексів протипухлинних препаратів з наноносіями D70-g-PNIPAM і D6-g-PNIPAM пов'язана з більш жорсткою молекулярною будовою у випадку D6-g-PNIPAM, що веде до обмеження конформаційних змін їх ланцюгів та зниження гідрофобності цих полімерів.

Підсумовуючи, створено нові високостабільні водорозчинні полімери D-g-PAAn і D-g-PNIPAM як носії протипухлинних препаратів Dox і Cis, що підтверджено даними FTIR та DLS спектроскопії.

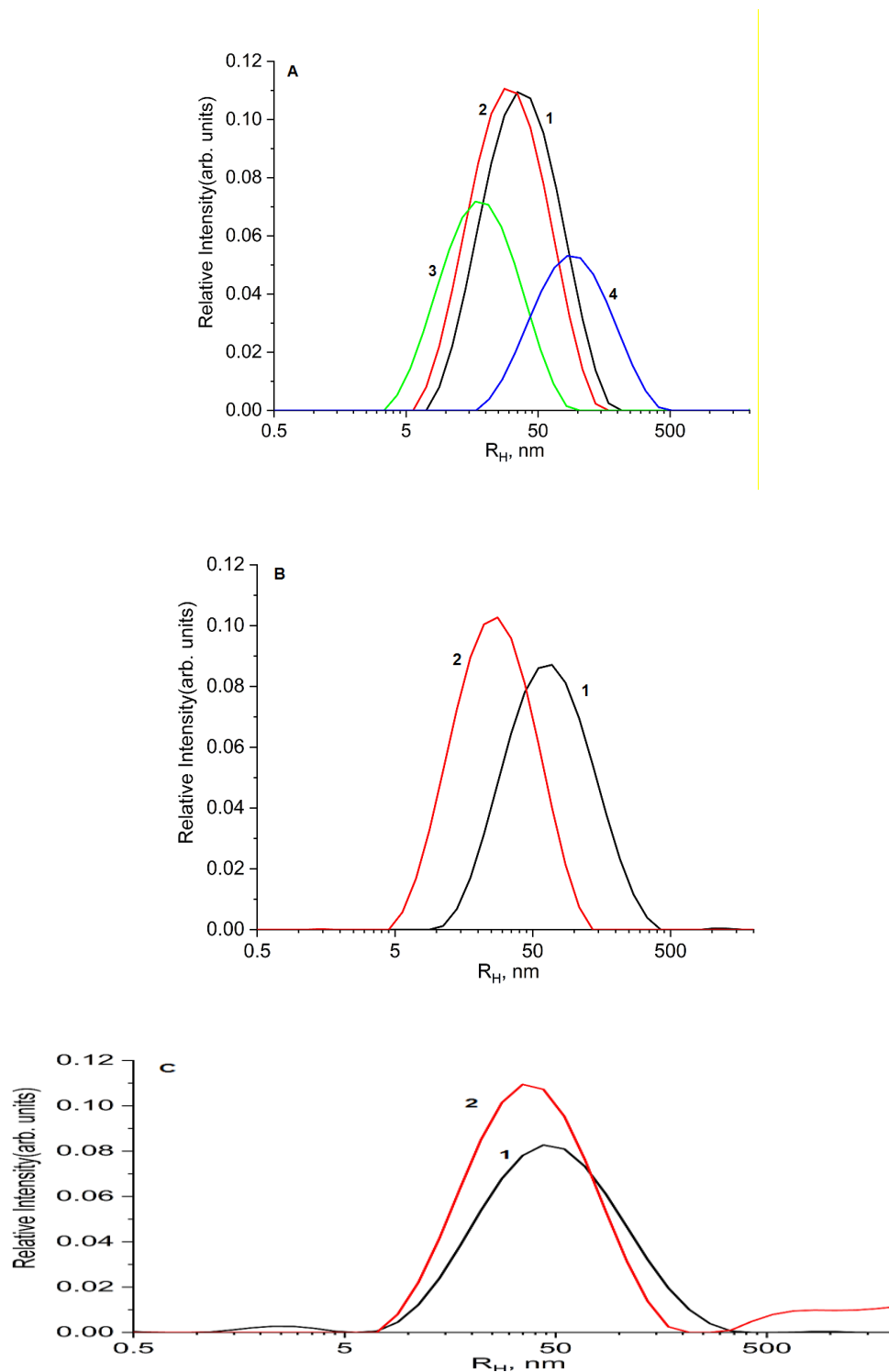


Рис. 3.8. Розподіл гідродинамічних радіусів для D70-g-PNIPAM (500 $\mu\text{г/мл}$) (1), D6-g-PNIPAM (500 $\mu\text{г/мл}$) (2), Dox (40 $\mu\text{г/мл}$) (3) та Cis (250 $\mu\text{г/мл}$) (4) (A), а також комплексів D70-g-PNIPAM+Dox (500 + 40 $\mu\text{г/мл}$) (1), D6-g-PNIPAM+Dox (500 + 40 $\mu\text{г/мл}$) (2) (B) та D70-g-PNIPAM+Cis (500 + 250 $\mu\text{г/мл}$) (1), D6-g-PNIPAM+Cis (500 + 250 $\mu\text{г/мл}$) (2) (C).

3.2. Токсичність та внутрішньоклітинна локалізація комплексів полімеру D-g-РААan з хіміопрепаратами Dox і Cis щодо клітин HeLa і MC3T3

3.2.1. Цитотоксичність комплексів полімеру D-g-РААan з хіміопрепаратами Dox і Cis

Для використання сполук з терапевтичними властивостями у біомедицині необхідною умовою є встановлення діапазону діючих і токсичних доз/концентрацій. З цією метою широкого використання набули такі методи оцінки життєздатності клітин як МТТ-тест та аналіз живі/мертві клітини, які дозволяють підібрати оптимальну дозу/концентрацію досліджуваних сполук для клітин різного гістогенезу.

Як видно з представлених результатів на рис. 3.9-3.10 частинки D-g-РААan не спричиняли токсичної дії упродовж 24 та 48 год на пухлинні клітини HeLa шийки матки людини та MC3T3 остеобластів.

За дії Dox у діапазоні концентрацій 1-5 $\mu\text{г/мл}$ життєздатність клітин HeLa знижувалася на (33-60)% і (45-68)% через 24 год і 48 год (рис. 3.9А), відповідно, відносно контрольних клітин. Після обробки клітин D-g-РААan+Dox цитотоксичний ефект Dox посилювався, про що свідчило зниження життєздатності клітин HeLa на (43-75)% і на (57-80)% через 24 год і 48 год, відповідно (рис. 3.9А).

Аналогічні ефекти спостерігали у дослідженнях з клітинами MC3T3 (рис. 3.10А), про що свідчило концентраційно-залежне зростання ефективності D-g-РААan+Dox. Крім того, D-g-РААan+Dox проявляв вищу токсичність щодо клітин MC3T3 порівняно з окремою дією Dox.

Слід відзначити, що комплекс D-g-РААan+Cis у досліджуваних концентраціях (5-20 $\mu\text{г/мл}$) виявляв меншу токсичність щодо пухлинних клітин порівняно з вільним Cis (рис. 3.9В, рис. 3.10В). І хоча концентрація молекул Cis була більшою за концентрацію молекул Dox у всіх досліджуваних зразках, припускається, що швидше за все кількість зв'язаних

і одночасно активних молекул Cis у структурі D-g-РААan є значно меншою, аніж молекул Dox, що зумовлено відмінністю у їх структурній геометрії.

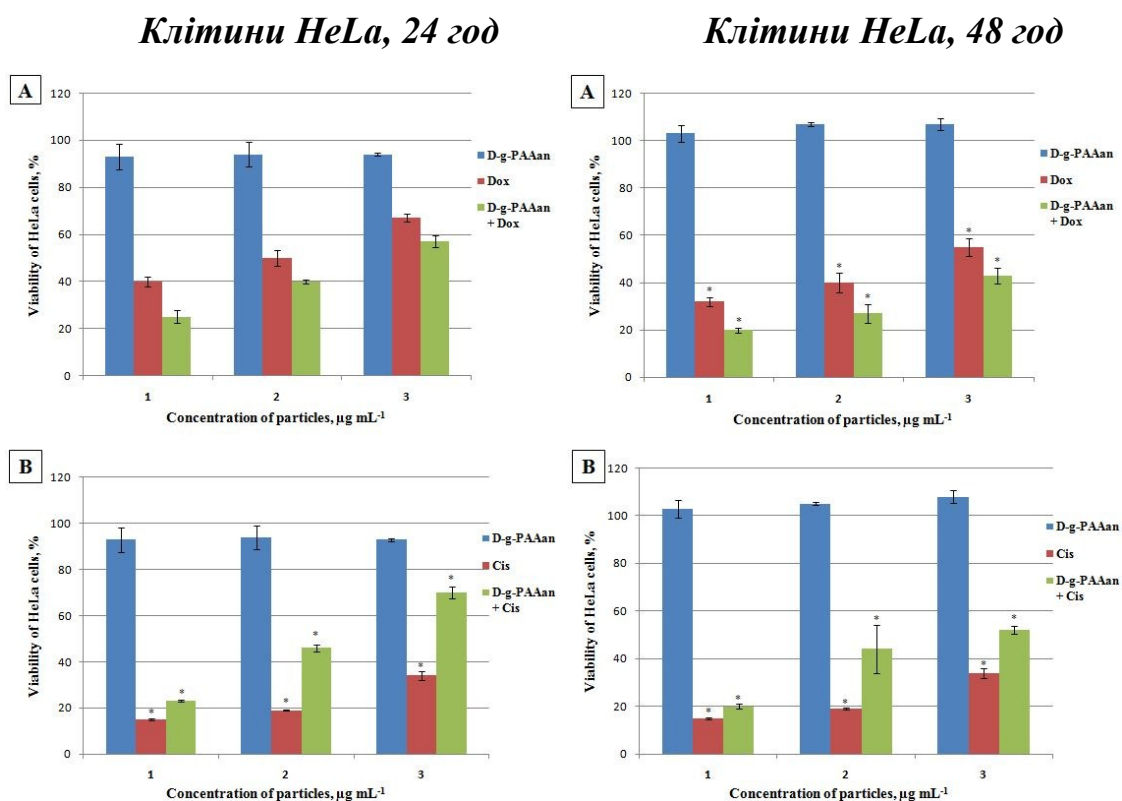


Рис. 3.9. Життєздатність клітин HeLa за МТТ-тестом через 24 і 48 год інкубації з: (А) частинками D-g-РААan, Dox і D-g-РААan+Dox у різних концентраціях: 125, 5 і 125+5 $\mu\text{g/mL}$ (1); 62,5, 2,5 та 62,5+2,5 $\mu\text{g/mL}$ (2); 25, 1 і 25+1 $\mu\text{g/mL}$ (3); (В) частинками D-g-РААan, Cis і D-g-РААan+Cis у різних концентраціях: 40, 20 і 40+20 $\mu\text{g/mL}$ (1); 20, 10 та 20+10 $\mu\text{g/mL}$ (2); 10, 5 та 10+5 $\mu\text{g/mL}$ (3) ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ відносно необроблених контрольних проб (клітини без добавок).

Таким чином, полімер D-g-РААan можна використовувати як ефективний носій протипухлинного препарату Dox.

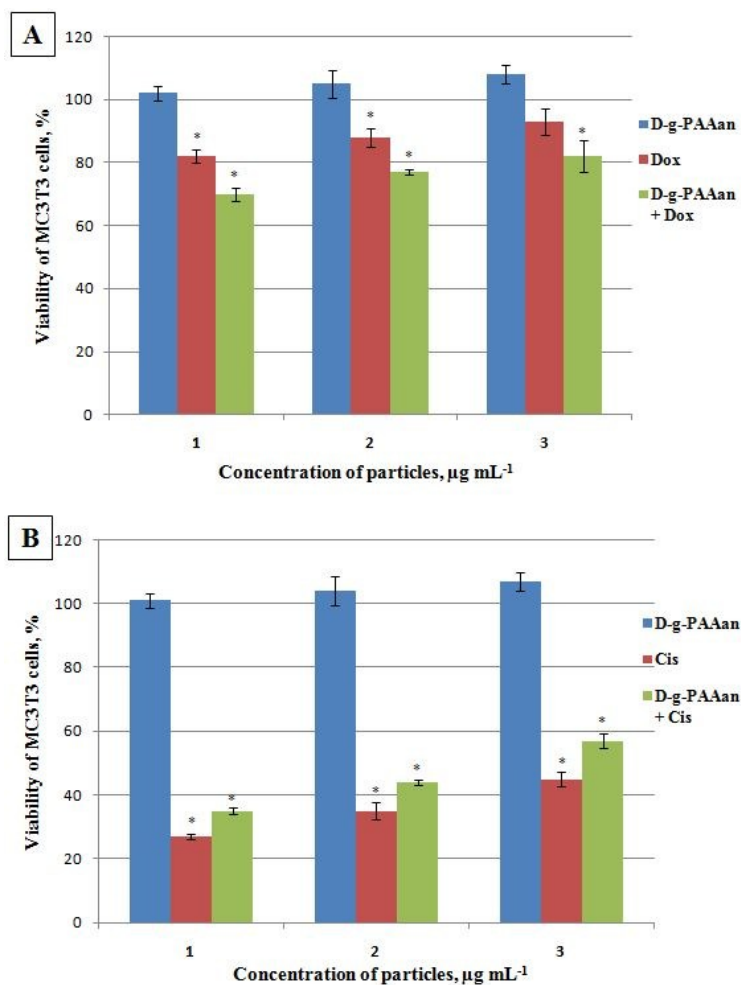


Рис. 3.10. Життєздатність клітин MC3T3 за МТТ-тестом через 48 год інкубації з: **(А)** частинками D-g-PAAan, Dox і D-g-PAAan+Dox у різних концентраціях: 125, 5 і 125+5 $\mu\text{g/mL}$ (1); 62,5, 2,5 та 62,5+2,5 $\mu\text{g/mL}$ (2); 25, 1 і 25+1 $\mu\text{g/mL}$ (3); **(В)** частинками D-g-PAAan, Cis і D-g-PAAan+Cis у різних концентраціях: 40, 20 і 40+20 $\mu\text{g/mL}$ (1); 20, 10 та 20+10 $\mu\text{g/mL}$ (2); 10, 5 та 10+5 $\mu\text{g/mL}$ (3) ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ відносно необроблених контрольних проб (клітини без добавок).

Згідно представлених результатів на рис. 3.11 і рис. 3.12 аналізу живі/мертві клітини видно, що як за окремої дії Dox і Cis, так і у комплексі з полімером D-g-PAAan поділ пухлинних клітин не відбувається.

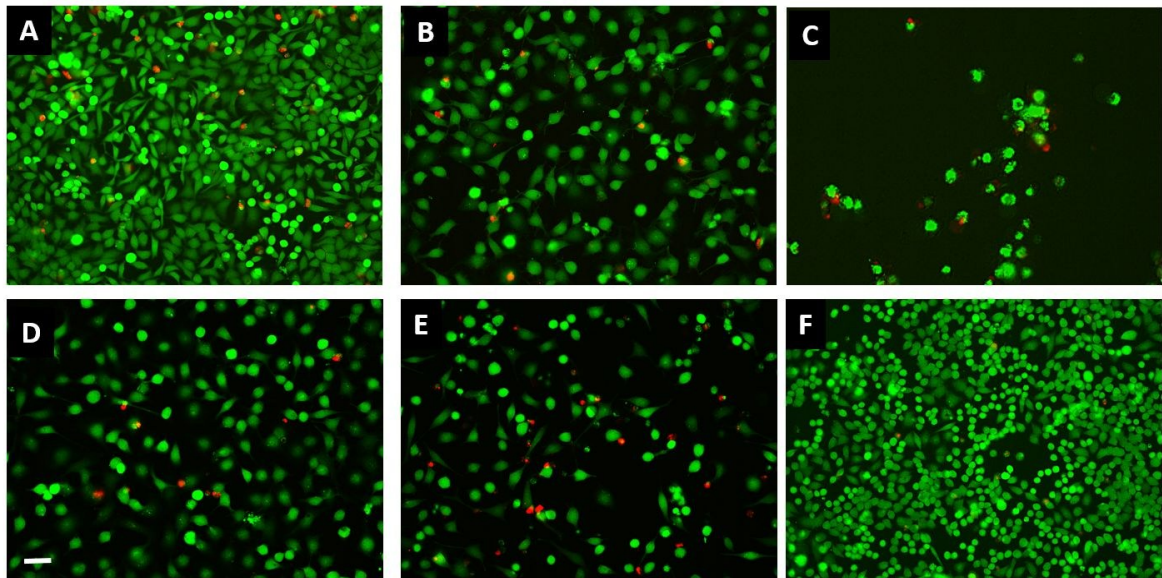


Рис. 3.11. Зображення пофарбованих живих/мертвих клітин HeLa через 48 год інкубації з добавками - **A:** D-g-PAAan (62,5 µг/мл); **B:** Dox (2,5 µг/мл), **C:** Cis (10 µг/мл); **D:** D-g-PAAan+Dox (62,5+2,5 µг/мл); **E:** D-g-PAAan+Cis (20+10 µг/мл); **F:** Контрольні (необроблені) клітини. Зелений колір - живі клітини, червоний колір – мертві клітини. Масштабна шкала 20 µм.

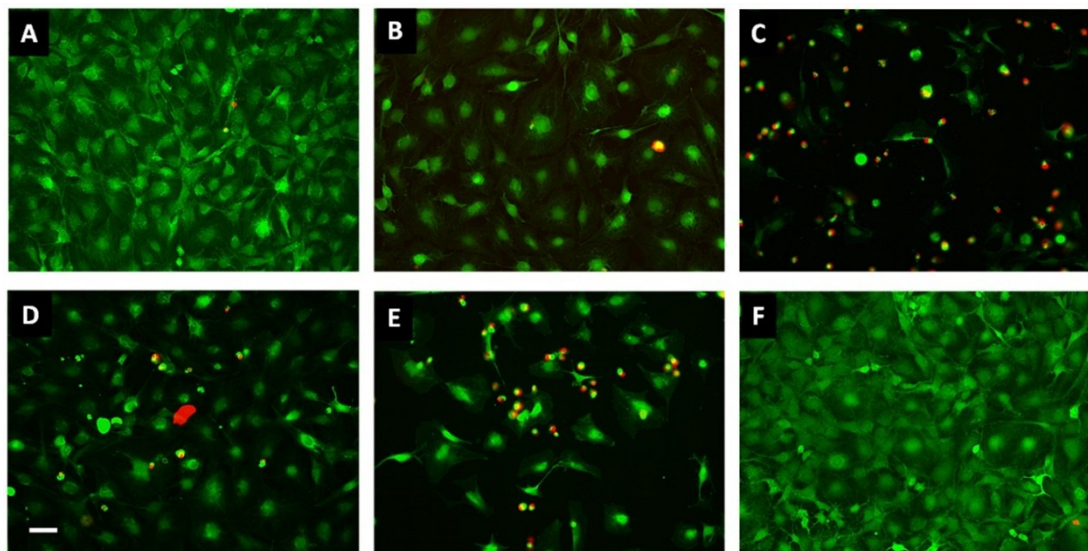


Рис. 3.12. Зображення пофарбованих живих/мертвих клітин MC3T3 через 48 год інкубації з **A:** D-g-PAAan (62,5 µг/мл); **B:** Dox (2,5 µг/мл); **C:** Cis (10 µг/мл); **D:** D-g-PAAan+Dox (62,5+2,5 µг/мл); **E:** D-g-PAAan+Cis (20+10 µг/мл); **F:** Контрольні (необроблені) клітини. Зелений колір - живі клітини, червоний колір - мертві клітини. Масштабна шкала 20 µм.

3.2.2. Внутрішньоклітинна локалізація комплексу D-g-РААan+Dox

Мембранотропну дію частинок на пухлинні клітини вивчали за допомогою конфокальної мікроскопії. Для цього, як флуоресцентну мітку, було використано Dox [80]. На рис. 3.13 продемонстровано внутрішньоклітинне накопичення та розподіл частинок D-g-РААan+Dox у клітинах HeLa та MC3T3 через 24 та 48 год інкубації. Зауважимо, що зразки ретельно промивали для видалення прилиплих або диспергованих частинок.

На рис. 3.14 у досліджуваних клітинах відмічено Z-стеки, згідно яких підтверджується накопичення частинок D-g-РААan+Dox саме всередині клітин HeLa та MC3T3, а не на їх поверхні.

Кардіотоксичність лікарського препарату Dox є одним з основних факторів, що обмежує його використання в експериментальній онкології. Прояв кардіотоксичної дії є дозо-залежним і різко посилюється за високих кумулятивних доз. Відтак, включення Dox у структуру полімеру D-g-РААan дозволяє не лише оптимізувати його протипухлинний ефект, але й підвищити діючу дозу препарату. Крім того, водорозчинний полімер D-g-РААan, як слабкий поліелектроліт (частинки частково заряджені в розчині), сильно чутливий до рН середовища [26]. Припускається, що полімер D-g-РААan може утримувати молекули Dox (або Cis) у зв'язаному стані (за рН~7,2 у модельній системі *in vitro*) і далі цілеспрямовано вивільняти їх у ділянку пухлини внаслідок зміни рН середовища (рН~5).

Нарешті, зазначимо, що ми враховували такі значення IC_{50} для Dox і Cis у клітинах HeLa за 24 год інкубації як 2,2 і 16,2 $\mu\text{г/мл}$, відповідно [81].

Підсумовуючи, встановлено, що водорозчинні частинки D-g-РААan+Dox знижують життєздатність клітин HeLa та MC3T3 у низьких концентраціях (1-5 $\mu\text{г/мл}$) через 24 і 48 год порівняно з окремою дією Dox (до 15%). Водночас, частинки D-g-РААan+Cis є низькотоксичні щодо клітин HeLa та MC3T3 у низьких концентраціях (5-20 $\mu\text{г/мл}$) через 24-48 год. За використання конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії продемонстровано поглинання частинок D-g-РААan+Dox пухлинними

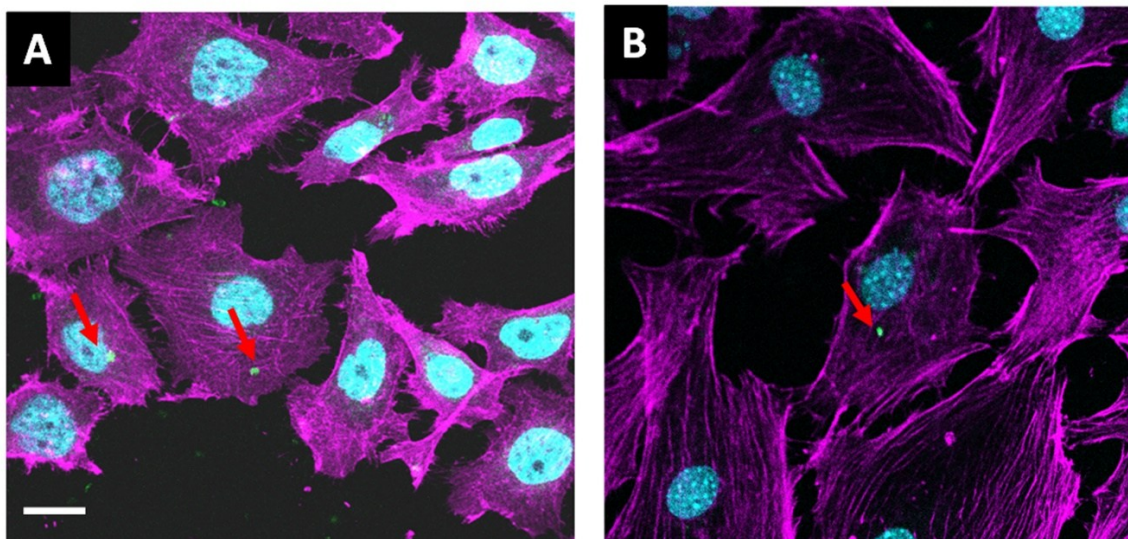


Рис. 3.13. Зображення конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії клітин HeLa (A) та MC3T3 (B) після 24 та 48 год, відповідно, інкубації з D-g-РААap+Dox (62,5+2,5 $\mu\text{г/мл}$). Стрілки вказують на накопичення частинок всередині пухлинних клітин. Фарбування актину (пурпуровий колір), ядер (синій колір) і частинок (зелений колір). Масштабна шкала 10 $\mu\text{м}$.

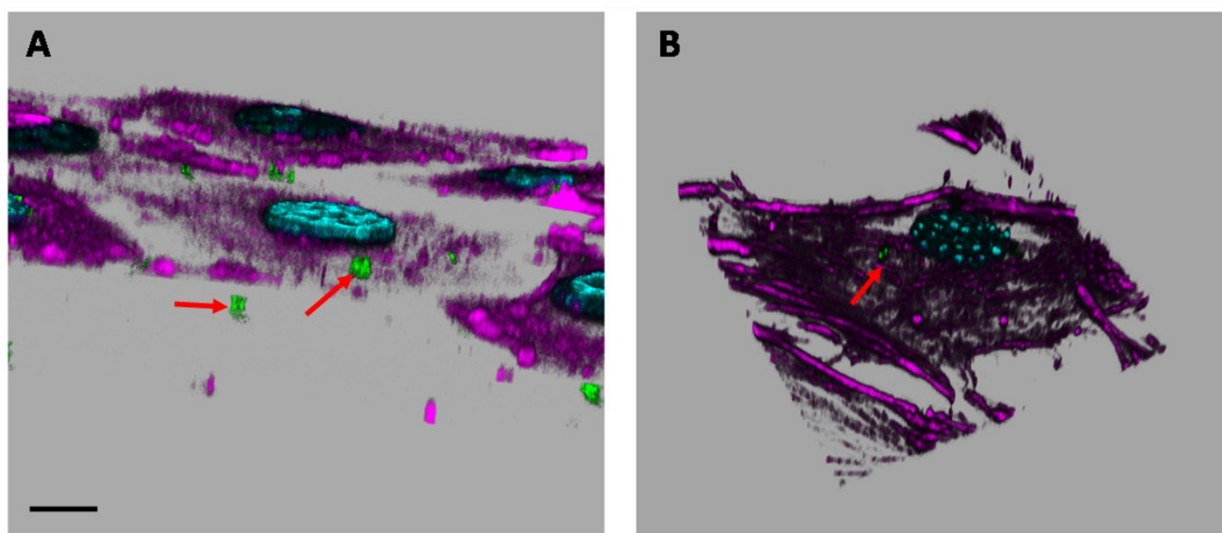


Рис. 3.14. Аналіз Z-стеків, проведений за допомогою конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії, зображень клітин HeLa (A) та MC3T3 (B) після 24 та 48 год, відповідно, інкубації з D-g-РААap+Dox (62,5+2,5 $\mu\text{г/мл}$). Стрілки вказують на накопичення частинок всередині пухлинних клітин. Масштабна шкала 10 $\mu\text{м}$.

клітинами *in vitro*. Ці результати вказують на потенційну можливість використання полімеру D-g-PAAan як перспективної наноплатформи для доставки протипухлинних ліків, зокрема Dox.

3.3. Токсичність комплексів полімеру D-g-PAAan з хіміопрепаратами Dox і Cis щодо клітин LLC миші, A549 людини і нормальних клітин HEL299 легень людини та механізм їх дії *in vitro*

3.3.1. Вивільнення хіміопрепаратів Dox і Cis з полімеру D-g-PAAan

Дослідження вивільнення хіміопрепаратів (Dox або Cis) з полімеру D-g-PAAan проводили у трьох повторах з використанням діалізу за різних значень рН середовища упродовж 48 год. Концентрацію вивільнених хіміопрепаратів (Dox або Cis) оцінювали за допомогою поєданого методу ВРХ та мас-спектрометрії (HPLC-ESI-MS/MS). Ми обрали значення рН=7,4 і рН=5,0, що імітувало рН крові та рН пухлинних клітин, яке, як відомо, є більш кислим порівняно з нормальними клітинами.

Обидві молекули хіміопрепаратів, Dox або Cis, вивільнялися з полімеру D-g-PAAan при кислому значенні рН середовища швидше, ніж при фізіологічному значенні рН середовища. Це можна пояснити тим, що при низькому рН поліелектролітний носій D-g-PAAan змінює свій гідрофільно-гідрофобний баланс і стає більш гідрофобним. СОО-групи прикріплених гідролізованих поліакриламідних ланцюгів перетворюються на -COOH при значенні рН=5,0. Відтак, це призводить до вивільнення інкапсульованих гідрофільних лікарських препаратів. Зауважимо, що молекула Cis виявилася більш гідрофільною порівняно з Dox (рис. 3.15).

У випадку рН=5,0 кумулятивне вивільнення Dox з полімеру D-g-PAAan досягало $91,9 \pm 9,2\%$ через 10 год, тоді як при рН=7,4 воно було повільнішим, досягаючи рівня $35,6 \pm 5,5\%$ і $61,6 \pm 7,2\%$ через 10 і 48 год, відповідно (рис. 3.15b).

Cis вивільнявся з полімеру D-g-PAAan ще швидше при рН=5,0, досягаючи рівня $52,6 \pm 2,2\%$ за 1 год порівняно з $9,0 \pm 1,0\%$ вивільненого Cis

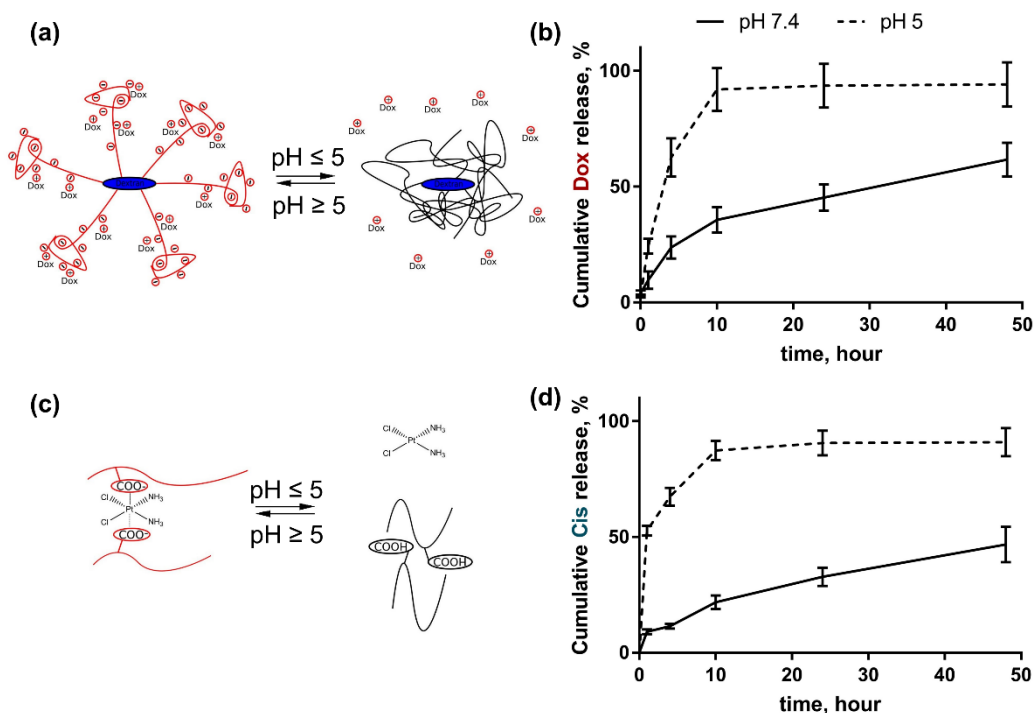


Рис. 3.15. Вивільнення хіміопрепарату з полімерної матриці D-g-PAAan: схематичне зображення вивільнення Dox (a) та Cis (c); кумулятивне вивільнення молекул Dox (b) і Cis (d) упродовж 48 год інкубації при значеннях рН=7,4 і рН=5,0 модельних середовищ.

при рН=7,4. Через 48 год вивільнення Cis становило $90,9 \pm 7,2\%$ і $46,7 \pm 7,3\%$ при рН=5,0 і рН=7,4, відповідно (рис. 3.15d).

3.3.2. Життєздатність клітин LLC, A549 і HEL299 за дії комплексів полімеру D-g-PAAan з хіміопрепаратами Dox і Cis

За використання МТТ-тесту ми оцінили вплив рН-чутливого полімеру D-g-PAAan окремо та у комплексі з хіміопрепаратами (Dox або Cis) на життєздатність клітин легень нормальних фібробластів HEL299 людини та карциномних A549 людини і LLC миші через 24 та 48 год після внесення сполук за різних концентрацій. Життєздатність клітин без додавання досліджуваних сполук приймали за 100 % (контроль).

Не було виявлено токсичного впливу частинок D-g-РААап на життєздатність клітин легень (дані не наведено), тоді як спостерігали концентраційно-залежні токсичні ефекти хіміопрепаратів за окремої дії.

Усі досліджені клітинні лінії легень показали вищу чутливість до Dox порівняно із Cis. Через 24 год після дії 0,25, 1,0 і 3,7 $\mu\text{г/мл}$ Dox життєздатність клітин LLC знижувалася до $87\pm 7\%$, $65\pm 5\%$ і $26\pm 2\%$, відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.16с). Тоді як через 24 год після дії 5, 20 і 40 $\mu\text{г/мл}$ Cis життєздатність клітин LLC знижувалася лише до $87\pm 6\%$, $77\pm 5\%$ і $65\pm 5\%$, відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.16d). Виявлено також незначне зниження життєздатності клітин A549 до $92\pm 6\%$, $89\pm 5\%$ і $81\pm 5\%$ через 24 год після внесення 1,85, 3,7 і 7,4 $\mu\text{г/мл}$ Dox, відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.16е). Тоді як через 24 год 5, 20 і 40 $\mu\text{г/мл}$ Cis спричиняв таку інгібуючу дію на життєздатність клітин A549: $83\pm 6\%$, $78\pm 5\%$ і $75\pm 5\%$, відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.16f).

Встановлено значний вплив інкапсульованих хіміопрепаратів у полімерну матрицю D-g-РААап на життєздатність клітин LLC та A549. Зокрема, показано, що клітини LLC є більш чутливі до комплексу D-g-РААап+Dox, а саме через 24 год після дії 1,85 $\mu\text{г/мл}$ Dox життєздатність клітин LLC знижувалася на $31\pm 2\%$ порівняно з окремою дією Dox (рис. 3.16с), тоді як життєздатність клітин A549 знижувалася на $34\pm 2\%$ через 48 год після дії D-g-РААап+Dox за концентрації Dox 3,70 $\mu\text{г/мл}$ порівняно з окремою дією цього хіміопрепарату (рис. 3.16е).

Частинки D-g-РААап характеризувалися пролонгованим впливом на токсичність Cis щодо карциномних клітин A549 людини та LLC миші (рис. 3.16с-f). Зокрема, через 48 год після додавання комплексу D-g-РААап+Cis життєздатність клітин LLC і A549 знижувалася на $26\pm 1\%$ і $21\pm 1\%$, відповідно, порівняно з окремою дією Cis в еквівалентній 20 $\mu\text{г/мл}$ концентрації (рис. 3.16d,f).

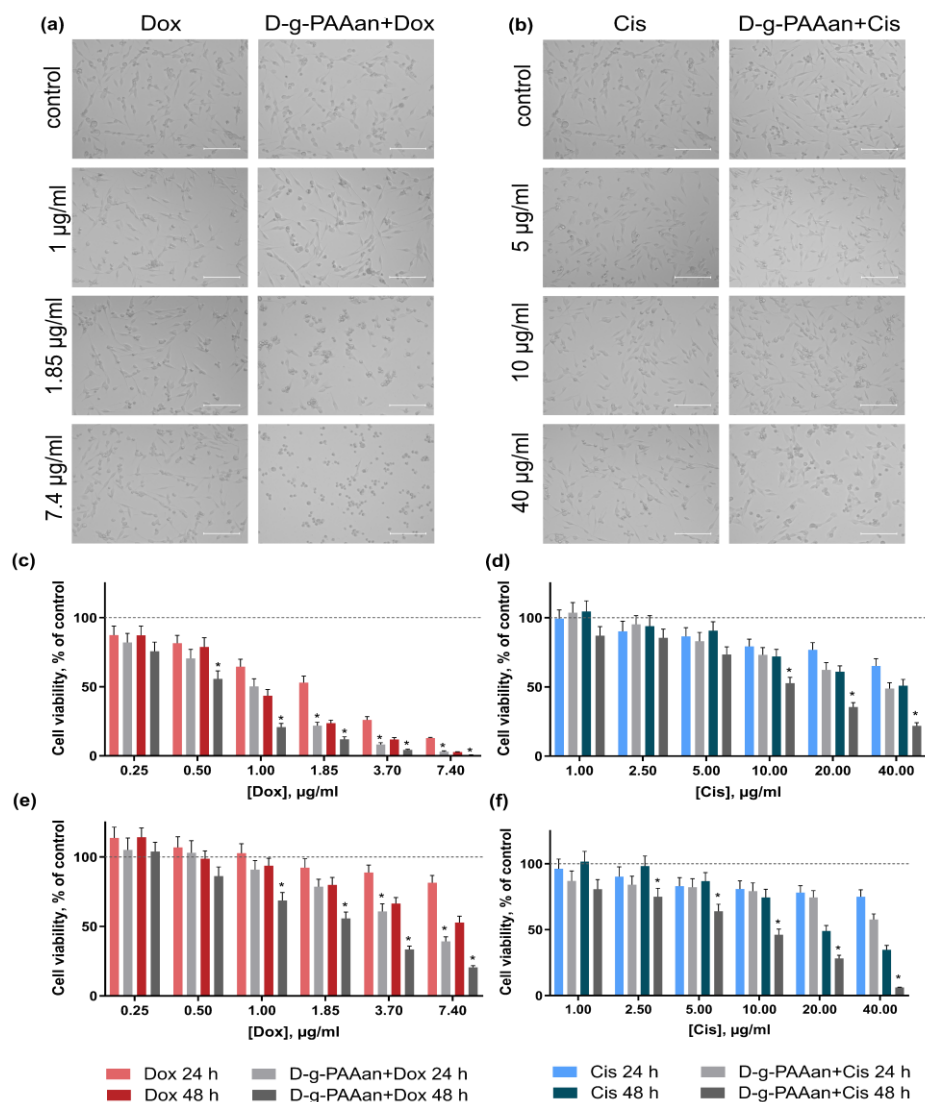


Рис. 3.16. Життєздатність клітин LLC після окремої дії хіміопрепаратів та у складі полімеру D-g-PAAan: фазово-контрастна мікроскопія клітин LLC, оброблених упродовж 24 год вільним Dox або комплексу D-g-PAAan+Dox за еквівалентних концентрацій Dox (a) або вільним Cis або комплексу D-g-PAAan+Cis за еквівалентних концентрацій Cis (b), масштабна шкала 150 µm; Життєздатність клітин LLC через 24 і 48 год після дії вільного Dox або комплексу D-g-PAAan+Dox за еквівалентних концентрацій Dox (c) або вільного Cis або комплексу D-g-PAAan+Cis за еквівалентних концентрацій Cis (d); Життєздатність клітин A549 через 24 і 48 год після дії вільного Dox або комплексу D-g-PAAan+Dox за еквівалентних концентрацій Dox (e) або вільного Cis або комплексу D-g-PAAan+Cis за еквівалентних концентрацій Cis (f); *p<0,05 порівняно з дією вільного хіміопрепарату.

Таблиця 3.4. Напівмаксимальна інгібуюча концентрація (IC_{50} , $\mu\text{г/мл}$) вільного хіміопрепарату та у складі полімеру D-g-PAAan, яка впливає на життєздатність досліджуваних клітин.

Клітинна лінія	LLC		A549	
Тривалість інкубації	24 h	48 h	24 h	48 h
Dox	1.8 ± 0.3	0.9 ± 0.2	19.1 ± 3.9	7.4 ± 3.1
D-g-PAAan+Dox	$0.9 \pm 0.2^*$	$0.5 \pm 0.1^*$	$5.6 \pm 2.4^*$	$2.2 \pm 1.2^*$
Cis	68 ± 2	34 ± 2	97 ± 3	23 ± 2
D-g-PAAan+Cis	$33 \pm 2^*$	$12 \pm 1.2^*$	$60 \pm 2^*$	$8 \pm 2.2^*$

* $p \leq 0,05$ порівняно з вільним хіміопрепаратом

Після обробки клітин комплексом D-g-PAAan+хіміопрепарат спостерігали значне зниження показника IC_{50} для нього (табл. 3.4).

Візуальні зміни кількості та морфології клітин LLC також спостерігали за використання фазово-контрастної мікроскопії. Як показано на рисунку 3.16a,b, комплексоутворення Dox і Cis з частинками D-g-PAAan спричиняло зменшення життєздатних клітин LLC через 24 год. Це вказує на здатність частинок D-g-PAAan посилювати токсичну дію молекул Dox і Cis на пухлинні клітини.

Слід зазначити, що нормальні клітини HEL299 фібробластів легень людини демонстрували однакову чутливість як до вільного Dox, так і до завантаженого у полімер D-g-PAAan (рис. 3.17a). Життєздатність клітин HEL299 через 48 год після обробки вільним $3,7 \mu\text{г/мл}$ Dox та завантаженим у полімер D-g-PAAan знижувалася до $58 \pm 4\%$ і $57 \pm 4\%$, відповідно. Значення показника IC_{50} для Dox істотно не змінилося після його комплексоутворення з частинками D-g-PAAan (табл. 3.5). Встановлено, що частинки D-g-PAAan захищали клітини HEL299 від цитотоксичності Cis (рис. 3.17b). Вільний і навантажений $20 \mu\text{г/мл}$ Cis у полімер D-g-PAAan знижував життєздатність клітин HEL299 до $23 \pm 2\%$ і $54 \pm 5\%$, відповідно. Таким чином, значення

показника IC_{50} для Cis у складі полімерної матриці D-g-PAAan було більшим у 2,6 рази порівняно з вільним Cis (табл. 3.5).

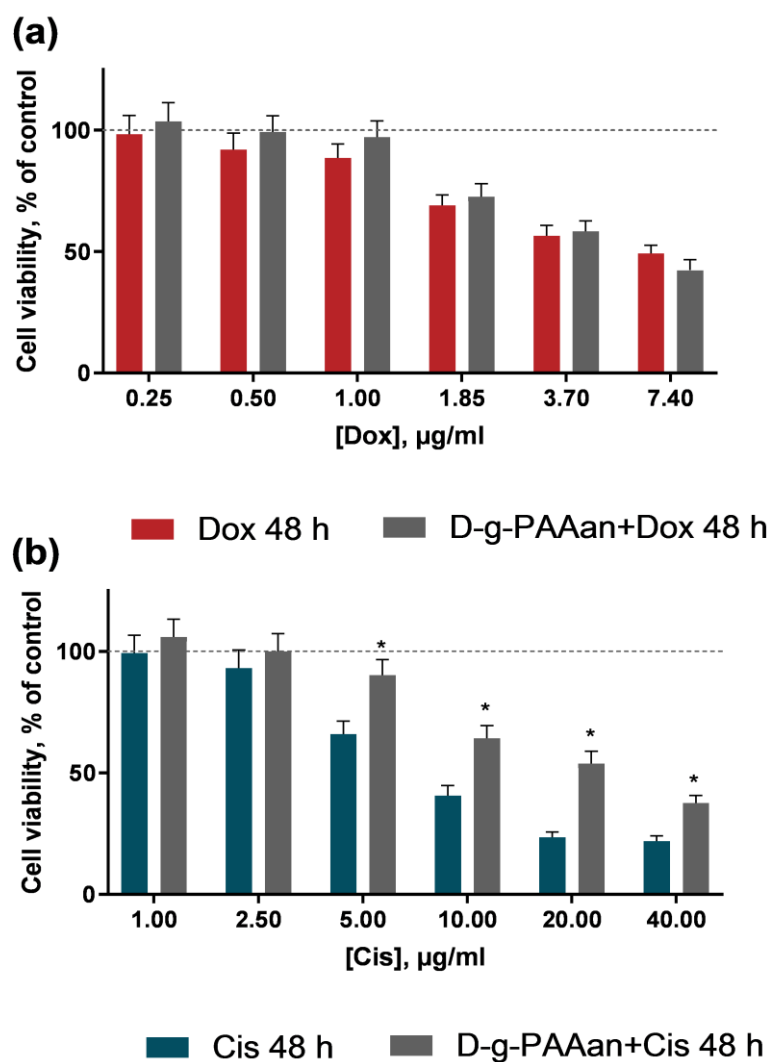


Рис. 3.17. Життєздатність нормальних клітин HEL299 фібробластів легень людини через 48 год після обробки: **(а)** – вільним Dox або комплексом D-g-PAAan+Dox в еквівалентних концентраціях Dox, **(б)** – вільним Cis або комплексом D-g-PAAan+Cis в еквівалентних концентраціях Cis; * $p < 0,05$ порівняно з дією вільного хіміопрепарату.

Таблиця 3.5. Напівмаксимальна інгібуюча концентрація (IC_{50} , $\mu\text{г/мл}$) вільного хіміопрепарату та у складі D-g-PAAn, яка впливає на життєздатність клітин HEL299.

Препарат	Dox	D-g-PAAn+Dox	Cis	D-g-PAAn+Cis
48 год	6 ± 1	5 ± 1	9 ± 2	$23\pm 4^*$

* $p \leq 0,05$ порівняно з вільним хіміопрепаратом

Підсумовуючи, показано, що досліджувані частинки D-g-PAAn підвищували токсичний потенціал хіміопрепаратів щодо карциномних клітин легень людини та миші (рис. 3.16с-f), але не щодо нормальних клітин фібробластів легень людини (рис. 3.17). Виявлені селективні цитотоксичні ефекти протипухлинних препаратів Dox і Cis за їх інкапсуляції у полімерну матрицю D-g-PAAn та подальшому вивільненні з неї у пухлинний сайт свідчать про відмінність взаємодії між синтезованими частинками та пухлинними клітинами порівняно з нормальними клітинами.

3.3.3. Продукування АФК у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PAAn з хіміопрепаратами Dox і Cis

Припускається, що індукція окисного стресу є перспективною у протипухлинній терапії, оскільки пухлинні клітини характеризуються високою чутливістю до підвищення рівня АФК [82,83].

Позаядерні ефекти як Dox, так і Cis базуються на індукції продукування АФК [84,85]. Внутрішньоклітинний рівень утворених АФК у клітинах LLC через 7, 20 і 27 год після дії вільних і завантажених Dox і Cis у полімер D-g-PAAn оцінювали за допомогою чутливого до окиснення флуоресцентного барвника 2,7-дихлорфлуоресцин діацетату (DCFH-DA) як кількісно, так і якісно (рис. 3.18). Продукування АФК необроблених клітин LLC (без додавання сполук) приймали за 100% (контроль).

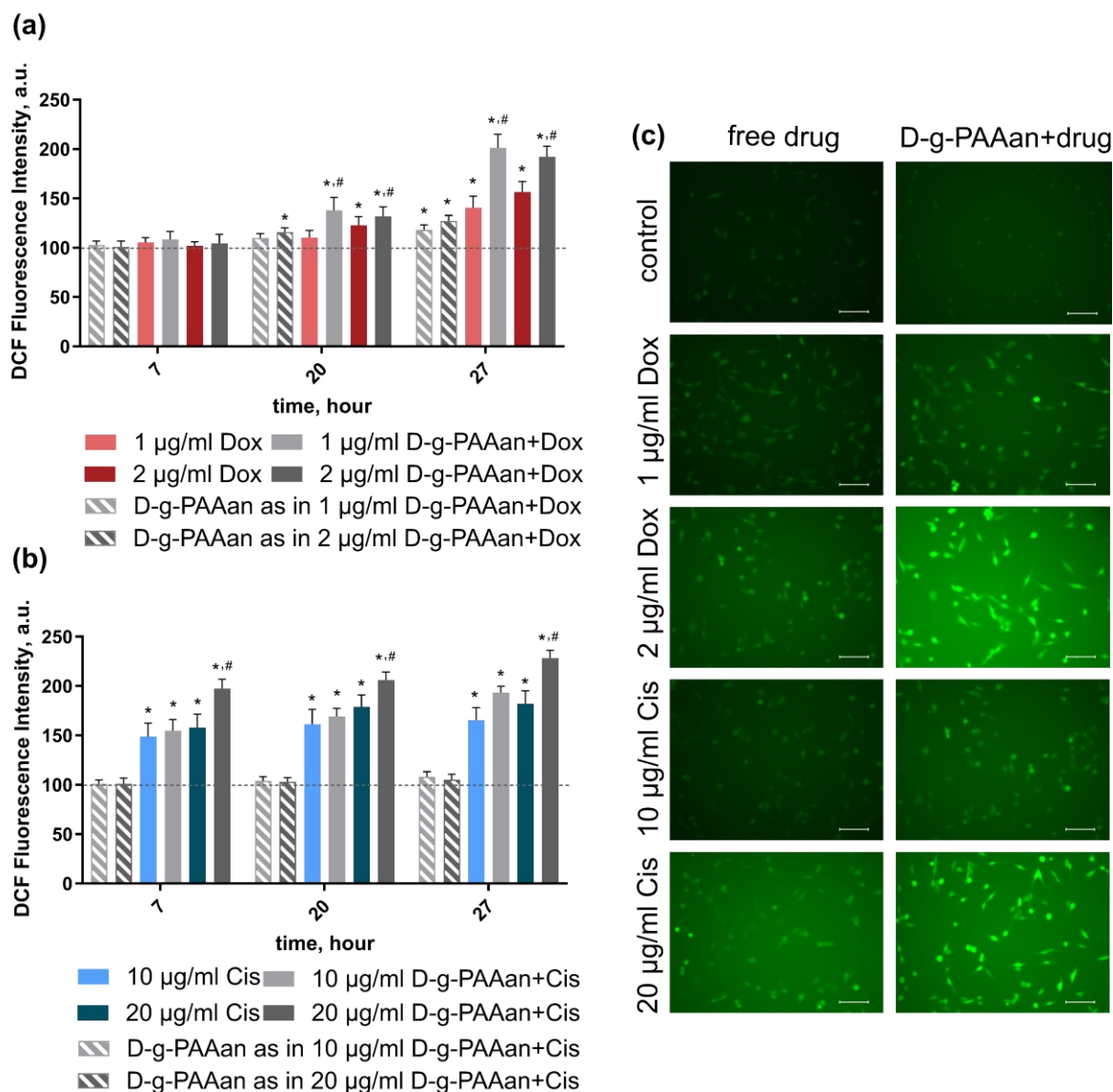


Рис. 3.18. Продукування АФК у клітинах LLC: (а) за окремої дії Dox, або за окремої дії полімеру D-g-PAAan, або за дії комплексу D-g-PAAan+Dox (1 і 2 $\mu\text{g}/\text{мл}$); (б) за окремої дії Cis, або за окремої дії полімеру D-g-PAAan, або за дії комплексу D-g-PAAan+Cis (10 і 20 $\mu\text{g}/\text{мл}$); * $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з окремою дією вільного хіміопрепарату; (с) зображення флуоресцентної мікроскопії клітин LLC, оброблених відповідними речовинами з подальшою 55-хв інкубацією з DCFH-DA; масштабна шкала 20 μm .

Підвищення концентрації хіміопрепаратів Dox і Cis за їх окремої дії, які додавали до середовища інкубації клітин LLC, спричиняло часо- та концентраційнозалежне збільшення внутрішньоклітинного продукування АФК (рис. 3.18), що вказувало на їх про-окисантну активність [86]. Таким чином, за окремої дії 2 $\mu\text{г/мл}$ Dox і 20 $\mu\text{г/мл}$ Cis рівень АФК у клітинах LLC зростав до $156\pm 11\%$ і $182\pm 13\%$ через 27 год інкубації, відповідно, відносно контролю (рис. 3.18a,b). За умови завантаження Dox або Cis у полімер D-g-РААan спостерігали подальше збільшення інтенсивності флуоресценції DCFH-DA, що супроводжується розвитком окисного стресу. Таким чином, 2 $\mu\text{г/мл}$ D-g-РААan+Dox і 20 $\mu\text{г/мл}$ D-g-РААan+Cis інтенсифікували продукування АФК, а саме рівень АФК зростав у клітинах LLC до $192\pm 10\%$ і $228\pm 8\%$ через 27 год інкубації, відповідно (рис. 3.18a,b). Одночасно за допомогою флуоресцентної мікроскопії було зафіксовано збільшення інтенсивності зеленої флуоресценції (рис. 3.18c).

Отже, отримані дані свідчать про те, що завантажені хіміопрепаратом Dox або Cis частинки полімеру D-g-РААan сприяють окисному стресу в клітинах LLC шляхом збільшення внутрішньоклітинної генерації АФК.

3.3.4. Активність каспази 3/7 у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-РААан з хіміопрепаратами Dox і Cis

АФК є важливими ініціаторами та медіаторами апоптозу [87], що свідчить про те, що створені водорозчинні полімерні матриці з інкапсульованими хіміопрепаратами здатні ініціювати апоптичний каскад загибелі пухлинних клітин. Для цього ми дослідили, чи виявлене зниження життєздатності клітин LLC та індукований окисний стрес після дії частинок D-g-РААан, навантажених хіміопрепаратом Dox або Cis, пов'язані з активністю каспази-3/7.

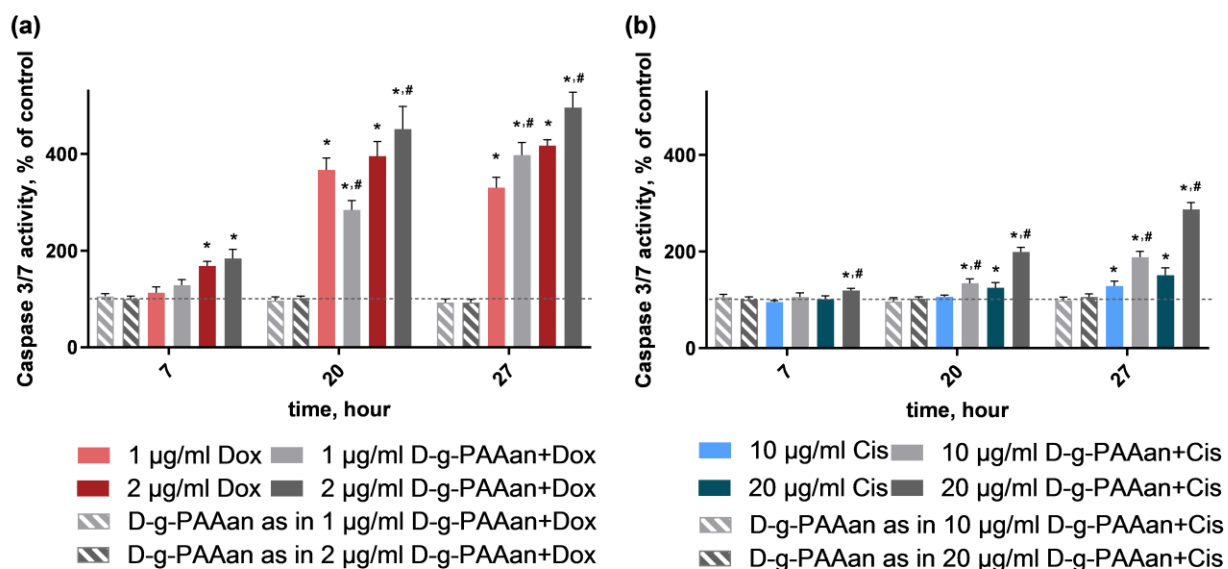


Рис. 3.19. Активність каспази 3/7 у клітинах LLC: **(а)** за окремої дії Dox, або за окремої дії полімеру D-g-PAAAn, або за дії комплексу D-g-PAAAn+Dox (1 і 2 µг/мл Dox); **(б)** за окремої дії Cis, або за окремої дії полімеру D-g-PAAAn, або за дії комплексу D-g-PAAAn+Cis (10 і 20 µг/мл Cis); * $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з окремою дією хіміопрепарату.

Активність каспази 3/7 у клітинах LLC без внесення досліджуваних сполук приймали за 100% (контроль). Показано, що частинки полімеру D-g-PAAAn не впливали на активність каспази-3/7, тоді як після окремої дії обох хіміопрепаратів 2 µг/мл Dox або 20 µг/мл Cis через 27 год спостерігали часо-залежне збільшення активності ферменту до $417 \pm 12\%$ і $151 \pm 15\%$, відповідно, відносно контролю (Рис. 3.22).

Після дії D-g-PAAAn+хіміопрепарат (Dox або Cis) виявлено подальше підвищення активності каспази-3/7 у клітинах LLC. Найбільш виразні ефекти D-g-PAAAn+хіміопрепарат спостерігали у віддалені терміни інкубації пухлинних клітин - через 27 год. Так, активність каспази-3/7 у клітинах LLC через 27 год після дії частинок D-g-PAAAn, навантажених 2 µг/мл Dox або 20 µг/мл Cis, була на рівні $496 \pm 32\%$ і $287 \pm 14\%$, відповідно, що є значно вищою порівняно з окремою дією хіміопрепарату (рис. 3.19).

Отримані результати свідчать, що і Dox, і Cis володіють вищим проапоптичним потенціалом за інкапсуляції у полімерну матрицю D-g-РААan.

3.3.5. Утворення 3D сфероїдів клітин LLC за дії комплексів полімеру D-g-РААan з хіміопрепаратами Dox і Cis

Тривимірна (3D) культура клітин формується при утворенні багатоклітинних сфероїдів. Ці *in vivo* подібні клітинні агрегати сприяють прямій міжклітинній взаємодії і, таким чином, моделюють структури та функції нативних органів і тканин. Багатоклітинні сфероїди імітують інтактні пухлини людини з подібною архітектурою тканин. Відтак, поведінка 3D-культивованих клітин насамперед відображає клітинні реакції *in vivo* і може більш точно прогнозувати інформацію про фармакологічну активність [88,89].

Щоб підтвердити можливу кореляцію посилення токсичного ефекту частинок D-g-РААan+хіміопрепарат з більш ефективним внутрішньоклітинним накопиченням хіміопрепарату, спочатку було вивчено поглинання 3D сфероїдами клітин LLC вільного Dox і комплексу D-g-РААan+Dox.

Відомо, що Dox інтенсивно поглинає і флуоресціює у видимій ділянці спектру, тому ми вивчали накопичення полімеру D-g-РААan, навантаженого Dox, за допомогою неінвазивних методів прямої флуоресценції. Для цього 3D сфероїди клітин LLC інкубували у присутності 7,40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox або D-g-РААan+Dox за еквівалентної концентрації хіміопрепарату.

Зображення флуоресцентної мікроскопії показують, що частинки D-g-РААan+Dox накопичувалися швидше, ніж вільний хіміопрепарат (фіксується більш яскрава внутрішньоклітинна флуоресценція; рис. 3.20а). Це свідчить

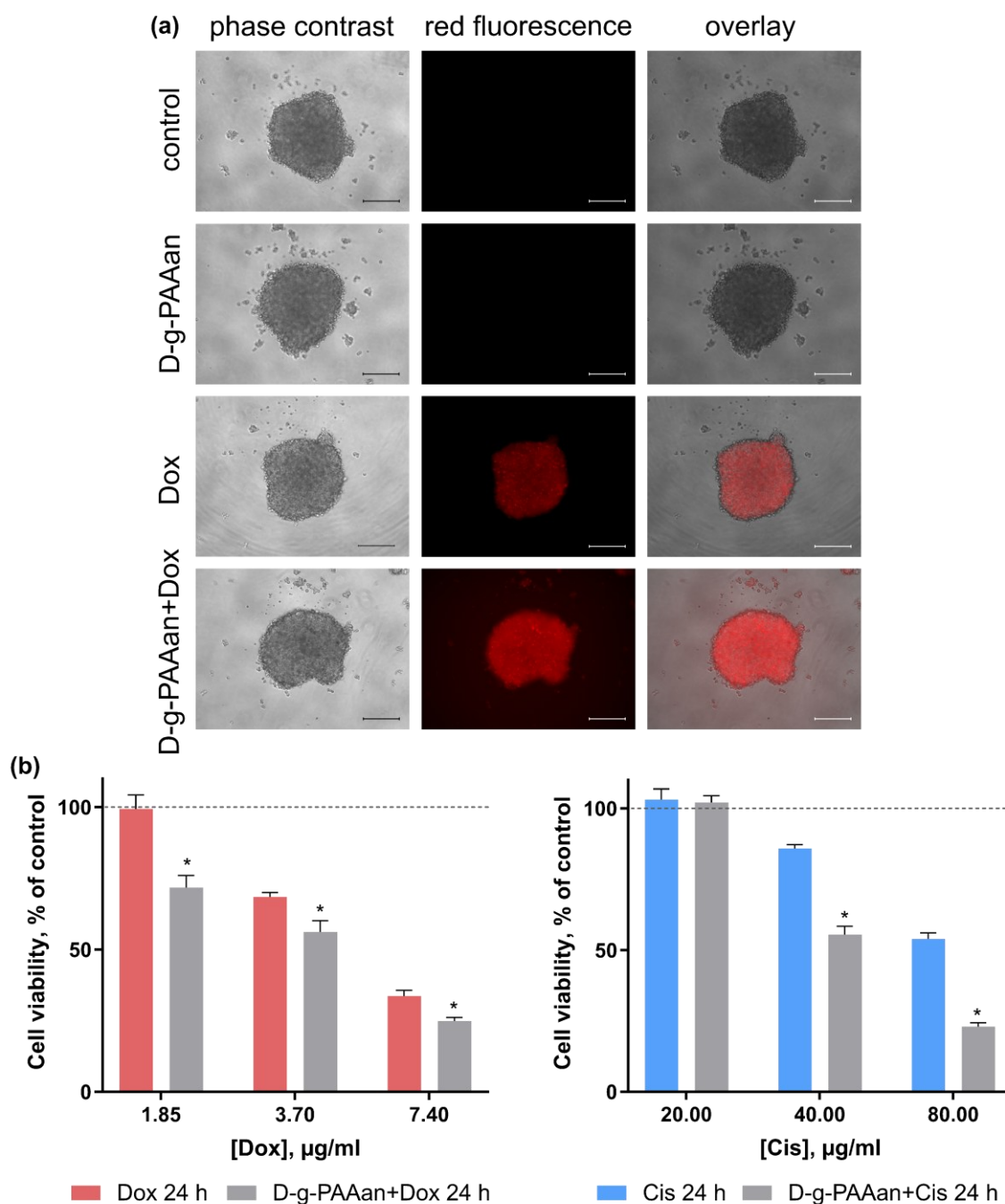


Рис. 3.20. 3D сфероїди клітин LLC через 24 год після окремої дії Dox, або комплексу D-g-PAAan+Dox в еквівалентній концентрації хіміопрепарату: **(a)** мікроскопія 3D сфероїдів клітин LLC через 24 год після окремої дії 7,4 µг/мл Dox або комплексу D-g-PAAan+Dox; масштабна шкала 250 µм; **(b)** життєздатність 3D сфероїдів клітин LLC через 24 год після окремої дії хіміопрепарату, або комплексу D-g-PAAan+хіміопрепарат в еквівалентній концентрації хіміопрепарату; * $p < 0,05$ порівняно з окремою дією вільного хіміопрепарату.

про їх ефективне накопичення у сфероїдах клітин LLC, що може бути пов'язано із взаємодією поверхонь цих частинок і клітин у 3D середовищі за відносно високої концентрації Dox: функціональні групи полімеру D-g-РААan частково зв'язані з молекулами Dox, що може призвести до екранування заряду у ланцюгах і хвостах D-g-РААan за низьких значень рН середовища.

Щоб оцінити можливий терапевтичний ефект комплексу D-g-РААan+хіміопрепарат на сфероїдній 3D моделі клітин LLC, ми дослідили їх життєздатність через 24 год після окремої дії Dox у зростаючій концентрації та комплексу D-g-РААan+Dox.

Показано, що вільний полімер D-g-РААan не впливав на життєздатність 3D сфероїдів клітин LLC, тоді як після обробки Dox спостерігали концентраційнозалежне зниження життєздатності цих клітин (рис. 3.20b). Так, через 24 год після дії 1,85, 3,70 і 7,40 $\mu\text{г/мл}$ Dox життєздатність 3D сфероїдів клітин LLC знижувалася до $99,4 \pm 5,0\%$, $68,4 \pm 1,6\%$ і $33,6 \pm 2,0\%$, відповідно, відносно контролю. Після завантаження Dox у полімерну матрицю D-g-РААan спостерігали посилення цитотоксичності порівняно з окремою дією хіміопрепарату: комплекс D-g-РААan+Dox за еквівалентної концентрації 1,85, 3,70 і 7,40 $\mu\text{г/мл}$ Dox пригнічував життєздатність 3D сфероїдів клітин LLC до $71,7 \pm 4,3\%$, $56,1 \pm 4,0\%$ і $24,9 \pm 1,2\%$, відповідно (рис. 3.20b).

Подібний ефект спостерігали при інкапсуляції Cis у частинки D-g-РААan. Цитотоксичність комплексу D-g-РААan+Cis по відношенню до 3D сфероїдів клітин LLC була вищою порівняно з окремою дією Cis за його еквівалентної концентрації (рис. 3.20c).

Отже, посилення внутрішньоклітинного накопичення Dox при транспортуванні у складі полімеру D-g-РААan та модулюючий ефект цитотоксичності хіміотерапевтичних препаратів Dox і Cis у складі полімеру D-g-РААan, що було виявлено на 3D сфероїдній моделі пухлинних клітин, свідчать про перспективність застосування створених водорозчинних

частинок полімеру D-g-PAAan для цільової доставки хіміопрепаратів у системі *in vivo*.

3.4. Токсичність комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis щодо клітин LLC і HeLa та механізм їх дії *in vitro*

3.4.1. Життєздатність клітин LLC та HeLa за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis

Вивчення біологічних ефектів досліджуваних водорозчинних полімерів D-g-PNIPAM як окремо, так і у комплексі з хіміопрепаратами, розпочали з оцінки їх цитотоксичних ефектів, а саме їхнього впливу на життєздатність чутливих і резистентних до Dox клітин LLC через 24 і 48 год після інкубації. Життєздатність клітин без внесення добавок приймали за 100% (контроль).

Не виявлено впливу полімерів D-g-PNIPAM (модифікації D6- та D70) за окремої дії у діапазоні концентрацій 5-20 $\mu\text{г/мл}$ на життєздатність клітин LLC упродовж досліджуваних термінів інкубації (дані не наведено). Водночас, за дії хіміопрепаратів (Cis і Dox) виявлено часо- і концентраційно-залежні токсичні ефекти як на чутливі, так і резистентні до Dox клітини LLC (рис. 3.21-3.24).

Життєздатність клітин LLC через 24 год після дії 20 і 40 $\mu\text{г/мл}$ Cis знижувалася на $33\pm 2\%$ та $50\pm 3\%$, відповідно, порівняно з контролем. Через 48 год часо-залежний цитотоксичний ефект Cis не посилювався, тобто життєздатність клітин LLC знаходилася на рівні 24 год інкубації (рис. 3.21).

Життєздатність резистентних клітин LLC/DoxR за дії 20 і 40 $\mu\text{г/мл}$ Cis через 24 год інкубації знижувалася на $33\pm 2\%$ і $45\pm 3\%$, відповідно, відносно контролю (без добавок), а через 48 год – на $25\pm 1\%$ і $33\pm 2\%$, відповідно (рис. 3.22).

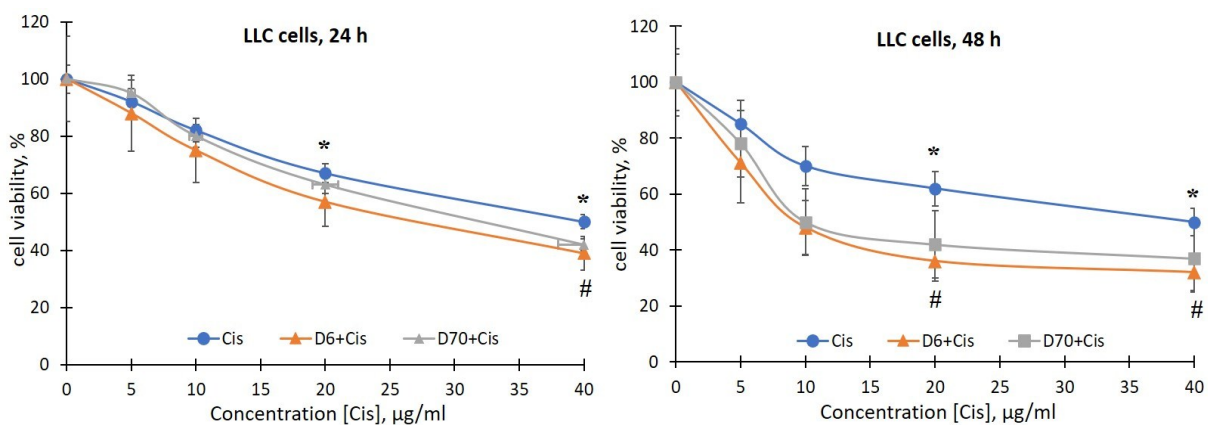


Рис. 3.21. Життєздатність клітин LLC через 24 і 48 год інкубації з вільним Cis або у складі водорозчинних комплексів D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Cis в еквівалентній концентрації цитостатику ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p < 0,05$ порівняно з дією вільного Cis.

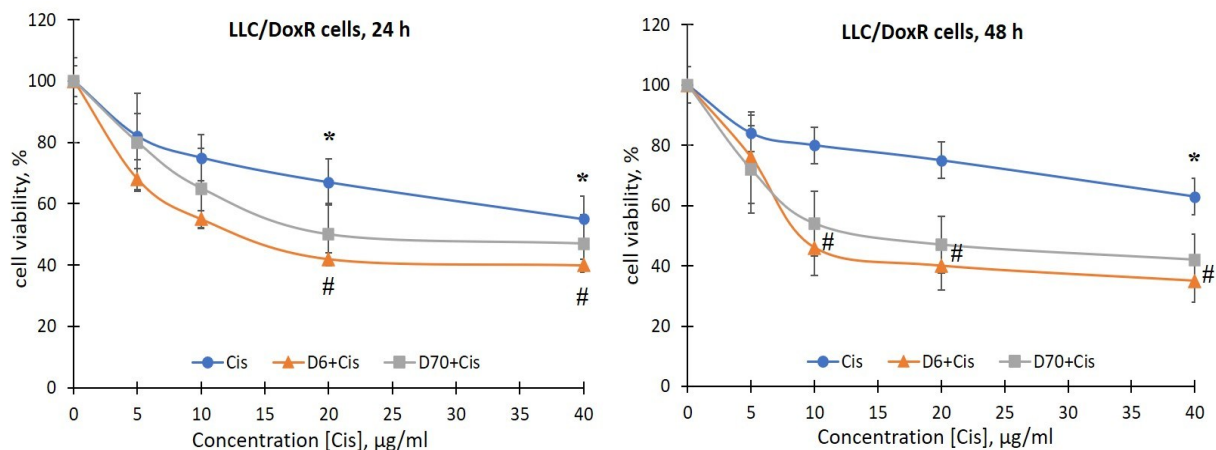


Рис. 3.22. Життєздатність клітин LLC/DoxR через 24 і 48 год інкубації з вільним Cis або у складі водорозчинних комплексів D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Cis в еквівалентній концентрації цитостатику ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p < 0,05$ порівняно з дією вільного Cis.

Отже, Cis у діапазоні концентрацій 20-40 µг/мл спричиняв токсичну дію як на чутливі, так і резистентні клітини LLC.

Токсичність Dox щодо клітин LLC (лінії чутливих та резистентних) порівняно з Cis була нижчою у 10 разів (рис. 3.21-3.24).

Життєздатність чутливих клітин LLC через 24 год після дії Dox за концентрацій 0,5, 1, 2 і 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ знижувалася на $22\pm 1\%$, $36\pm 2\%$, $42\pm 3\%$ та $52\pm 4\%$, відповідно, відносно контролю. Через 48 год негативні ефекти Dox спостерігали після інкубації клітин LLC за присутності 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (кількість життєздатних клітин знижувалася на $25\pm 1\%$), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (на 39%) та 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (на $42\pm 3\%$) хіміопрепарату (рис. 3.23).

Згідно отриманих результатів резистентна лінія до Dox клітин LLC виявилася стійкою до токсичної дії Dox, про що свідчила відсутність значного впливу на життєздатність клітин упродовж досліджуваних термінів (рис. 3.24). Життєздатність клітин LLC/DoxR після дії 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox через 24 і 48 год інкубації знижувалася лише на $28\pm 1\%$ та $24\pm 1\%$, відповідно, відносно контролю.

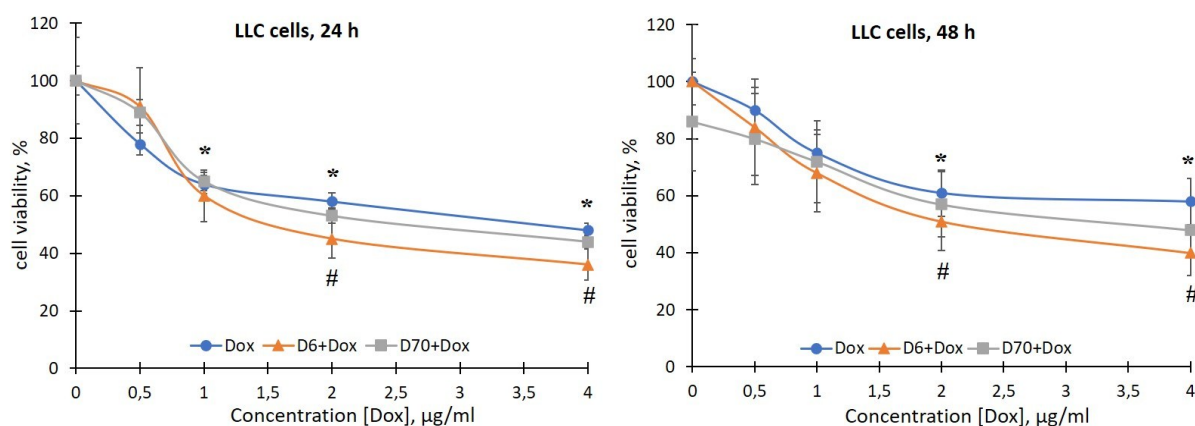


Рис. 3.23. Життєздатність клітин LLC через 24 і 48 год інкубації з вільним Dox або у складі водорозчинних комплексів D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Dox в еквівалентній концентрації цитостатику ($M\pm m$, $n=5$). * $p<0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p<0,05$ порівняно з дією вільного Dox.

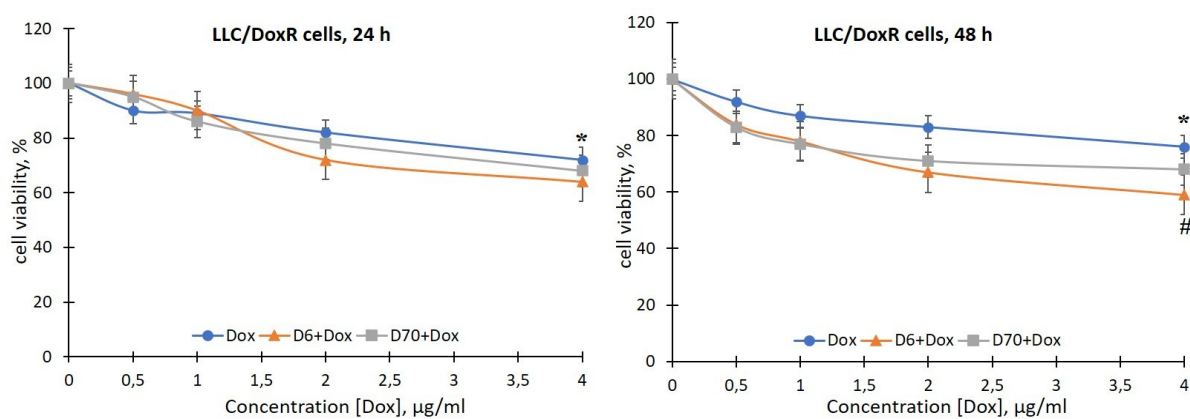


Рис. 3.24. Життєздатність клітин LLC/DoxR через 24 і 48 год інкубації з вільним Dox або у складі водорозчинних комплексів D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Dox в еквівалентній концентрації цитостатику ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p < 0,05$ порівняно з дією вільного Dox.

Таблиця 3.6. Значення показника IC_{50} за дії досліджуваних сполук для чутливих і резистентних клітин LLC.

IC ₅₀ , µг/мл за хіміопрепаратом	Клітини LLC		Клітини LLC/DoxR	
	24 год	48 год	24 год	48 год
Cis	45.86	40.30	52.82	78.98
D6-g-PNIPAM+Cis	31.32	12.44	16.49	13.95
D70-g-PNIPAM+Cis	38.40	16.06	22.72	19.17
Dox	2.89	4.33	10.38	11.90
D6-g-PNIPAM+Dox	1.92	2.36	6.67	5.14
D70-g-PNIPAM+Dox	3.09	3.12	8.18	7.31

Результати токсичної дії хіміопрепаратів на клітини LLC було також підтверджено показником IC_{50} (табл. 3.6). Зокрема, показник IC_{50} через 24 і

48 год після дії Cis для чутливих клітин LLC становив 45.86 і 40.30 $\mu\text{г/мл}$, відповідно, а для резистентних клітин LLC/DoxR - 52.82 і 78.98 $\mu\text{г/мл}$, відповідно. Показник IC_{50} через 24 і 48 год після дії Dox для чутливих клітин LLC становив 2.89 і 4.33 $\mu\text{г/мл}$, відповідно, а для резистентних клітин LLC/DoxR - 10.38 і 11.90 $\mu\text{г/мл}$, відповідно.

Отримані дані свідчать про стійкість клітин LLC до токсичної дії хіміопрепаратів і значення показника IC_{50} за їх дії узгоджуються з літературними даними. Так, показник IC_{50} після дії Cis через 24 год для клітин LLC становив ≥ 50 $\mu\text{г/мл}$ [90] і для клітин раку легені A549 - 55 $\mu\text{г/мл}$ [91] і 64 $\mu\text{г/мл}$ [92].

Значення IC_{50} за дії Dox для клітин A549 становило 0,13 $\mu\text{г/мл}$ [93] та 2 $\mu\text{г/мл}$ [94]. Показник IC_{50} для клітин A549 через 48 год після дії Dox становив 0,6 $\mu\text{г/мл}$ та через 72 год – 0,23 $\mu\text{г/мл}$ [95].

Далі було оцінено вплив комплексів полімерів D(D6 або D70)-g-PNIPAM з хіміопрепаратами на життєздатність чутливих і резистентних клітин LLC. Показано, що через 24 год після додавання комплексів полімер D(D6 або D70)-g-PNIPAM + хіміопрепарат (Cis або Dox) до суспензії чутливих клітин LLC спостерігали незначне посилення токсичних ефектів цитостатиків (рис. 3.21, 3.23). Водночас, через 48 год життєздатність клітин LLC значно знижувалася після дії 10, 20 і 40 $\mu\text{г/мл}$ D6-g-PNIPAM+Cis за еквівалентної концентрації Cis на $22\pm 1\%$, $26\pm 1\%$ і $18\pm 1\%$, відповідно, та у присутності 10 і 20 $\mu\text{г/мл}$ D70-g-PNIPAM+Cis за еквівалентної концентрації Cis на $20\pm 1\%$ порівняно з окремою дією Cis і 4 $\mu\text{г/мл}$ D6-g-PNIPAM+Dox на $18\pm 1\%$ порівняно з окремою дією Dox за еквівалентної концентрації (рис. 3.21, 3.23).

Слід зазначити, що чутливість резистентних до Dox клітин LLC/DoxR до дії досліджуваних комплексів полімерів з хіміопрепаратами була вищою порівняно з чутливими клітинами LLC, що свідчить про посилення цитотоксичних ефектів хіміопрепаратів полімерами та модифікацію процесів стійкості у клітин до цитостатиків. Зокрема, життєздатність клітин

LLC/DoxR після дії D6-g-PNIPAM+Cis і D70-g-PNIPAM+Cis знижувалася часо- і концентраційно-залежно. Так, цей показник через 24 год після інкубації клітин LLC/DoxR за дії 10 і 20 $\mu\text{г/мл}$ D6-g-PNIPAM+Cis знижувався на $20\pm 1\%$ і $25\pm 1\%$, відповідно, а через 48 год – на $34\pm 2\%$ і $35\pm 2\%$, відповідно, порівняно з окремою дією Cis за еквівалентної концентрації (рис. 3.22). Після дії D70-g-PNIPAM+Cis цитотоксичний ефект спостерігали лише через 48 год, а саме життєздатність клітин LLC/DoxR знижувалася на $26\pm 1\%$, $28\pm 1\%$ і $21\pm 1\%$ за концентрацій комплексу 1, 2 і 4 $\mu\text{г/мл}$, відповідно, порівняно з окремою дією Cis в еквівалентній концентрації (рис. 3.22). За дії 4 $\mu\text{г/мл}$ D6-g-PNIPAM+Dox життєздатність клітин LLC/DoxR знижувалася на $17\pm 1\%$ порівняно з окремою дією Dox за еквівалентної концентрації через 48 год (рис. 3.24).

Крім того, встановлено, що токсичність Cis у комплексі з полімерами D6- або D70-g-PNIPAM щодо клітин LLC підвищується і при низьких концентраціях хіміопрепарату. Більш виражені токсичні ефекти спостерігали після дії полімеру D6-g-PNIPAM із Cis через 48 год інкубації, про що свідчило зниження удвічі життєздатності чутливих і резистентних клітин LLC порівняно з окремою дією хіміопрепарату в еквівалентній концентрації.

Було досліджено вплив комплексу D70-g-PAAn+Dox на життєздатність клітин HeLa. За використання МТТ-тесту показано, що через 24 год інкубації D70-g-PNIPAM у діапазоні досліджуваних концентрацій (125, 62,5 і 25 $\mu\text{г/мл}$) не впливав на життєздатність клітин HeLa (рис. 3.25). Крім того, ми також показали, що D70-g-PNIPAM не спричиняв токсичного впливу на нормальні клітини HEK293 ембріональної нирки людини (дані не наведено). За дії Dox спостерігали дозо-залежний цитотоксичний ефект, а саме зниження життєздатності клітин HeLa у досліджуваному діапазоні концентрацій (1-5) $\mu\text{г/мл}$ на $(30-74\pm 3)\%$, відповідно, порівняно з контролем. Через 24 год після дії D70-g-PNIPAM+Dox токсична дія на клітин HeLa посилювалася, а саме цей показник знижувався залежно від концентрацій на $(43-86\pm 4)\%$, відповідно (рис. 3.25).

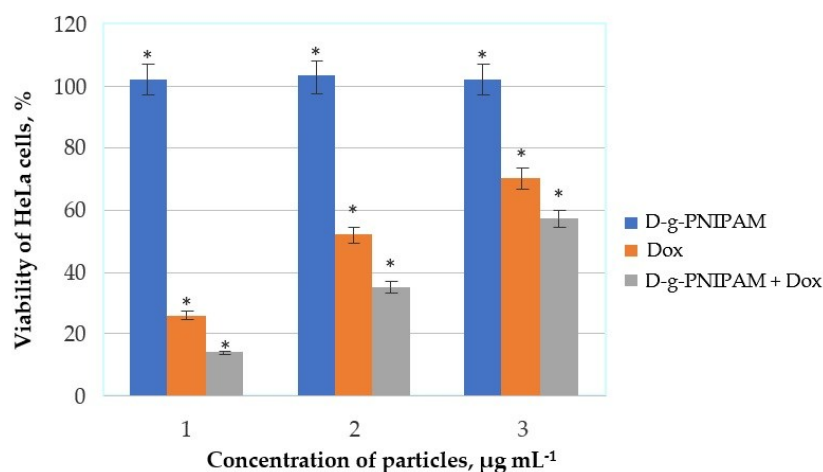


Рис. 3.25. Життєздатність клітин HeLa за МТТ-тестом через 24 год після інкубації з полімером D70-g-PNIPAM, Dox і комплексом D70-g-PNIPAM+Dox за різних концентрацій: 125 і 5 та 125+5 $\mu\text{g/mL}$ (1); 62,5 і 2,5 та 62,5+2,5 $\mu\text{g/mL}$ (2); 25 і 1 та 25+1 $\mu\text{g/mL}$ (3). * $p < 0,05$ відносно необроблених (контрольних) клітин (без добавок).

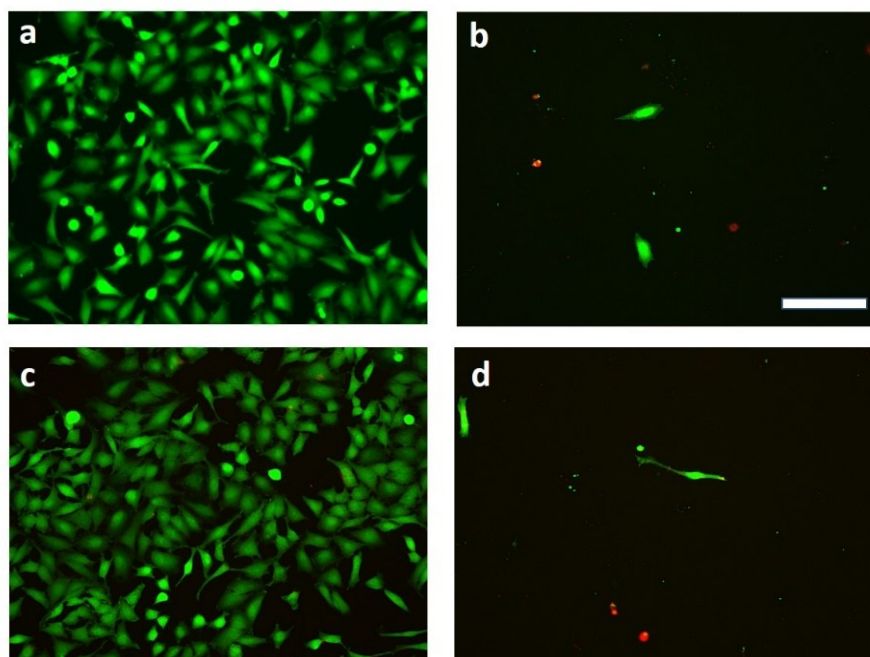


Рис. 3.26. Зображення пофарбованих живих/мертвих клітин HeLa після 24 год інкубації з: (a) полімером D70-g-PNIPAM (62,5 $\mu\text{g/mL}$); (b) Dox (2,5 $\mu\text{g/mL}$); (c) контрольними (необробленими) клітинами; (d) комплексом D70-g-PNIPAM+Dox (62,5+2,5 $\mu\text{g/mL}$). Зелений колір - живі клітини, червоний колір – мертві клітини; масштабна шкала 20 μm .

Аналіз за методом живі/мертві клітини (рис. 3.26) показав, що через 24 год інкубації після як окремої дії Dox, так і у складі комплексу з D70-g-PNIPAM поділ клітин HeLa не відбувався.

Таким чином, за використання МТТ-тесту не виявлено токсичної дії частинок D70-g-PNIPAM у досліджуваному діапазоні на нормальні (непухлинні) клітини HEK293, а також на пухлинні клітини HeLa упродовж 24 год (рис. 3.25). Навпаки, ефективність цитотоксичної дії частинок D70-g-PNIPAM+Dox зростала зі збільшенням концентрації Dox у середньому в 1,5 рази порівняно з окремою дією Dox. Крім того, аналіз живі/мертві клітини показав, що вільний Dox і його композиція з D70-g-PNIPAM не дозволяли пухлинним клітинам ділитися (рис. 3.26).

Наступним етапом роботи було дослідити біохімічні механізми цитотоксичної дії комплексів полімерів D6- або D70-g-PNIPAM з хіміопрепаратами, які можуть реалізуватися на цитозольному рівні.

3.4.2. Продукування АФК у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis

Для з'ясування механізмів токсичної дії досліджуваних сполук, які реалізуються внаслідок індукції окисного стресу ми оцінили продукування АФК у чутливих і резистентних клітинах LLC через 18 год після додавання хіміопрепаратів, полімерів та їх комплексів за використання флуоресцентного зонду DCF-DA і спектрофлуориметрії. Продукування АФК у клітинах без внесення добавок приймали за 100% (контроль).

Показано, що водорозчинні полімери D6- і D70-g-PNIPAM не індуквали продукування АФК у клітинах LLC та LLC/DoxR через 18 год інкубації (рис. 3.27, 3.28), значення були наближені до контрольних.

Як відомо, хіміопрепарати, зокрема Cis і Dox, є індукторами окисного стресу, цитотоксична дія яких супроводжується надмірною продукцією АФК [30,84,85,96].

Так, за дії 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cis та 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox у клітинах LLC рівень АФК зростав на 19% та 15%, відповідно, порівняно з контролем на 45 хв. Тоді як у клітинах LLC/DoxR хіміопрепарати не спричиняли продукування АФК, що вказує на резистентні властивості лінії клітин (рис. 3.27, 3.28).

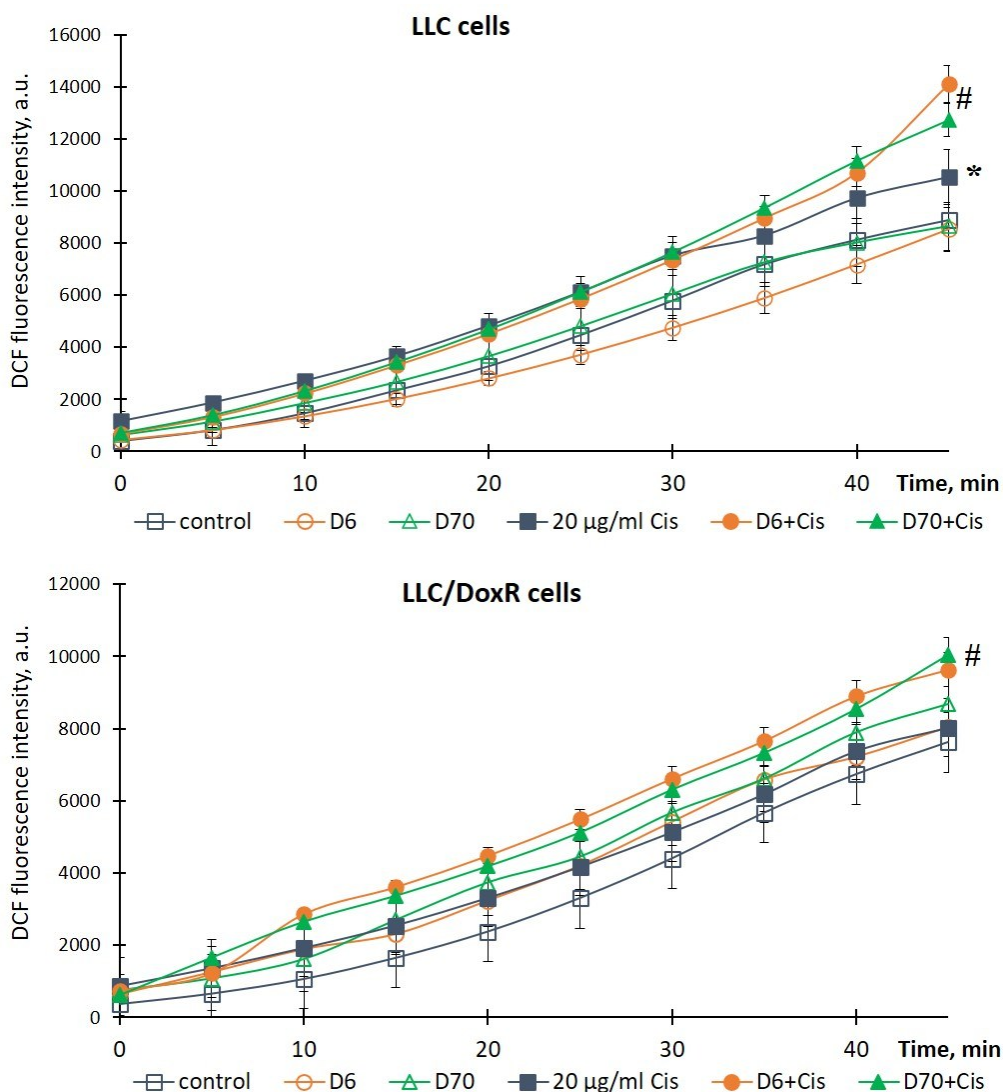


Рис. 3.27. Динаміка продукування АФК у клітинах LLC та LLC/DoxR через 18 год у контролі, за дії вільного Cis (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) або у складі водорозчинних комплексів D6- або D70-g-PNIPAM+Cis в еквівалентній концентрації цитостатику ($M \pm m$, $n=5$). * $p<0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p<0,05$ порівняно з дією вільного Cis за еквівалентної концентрації.

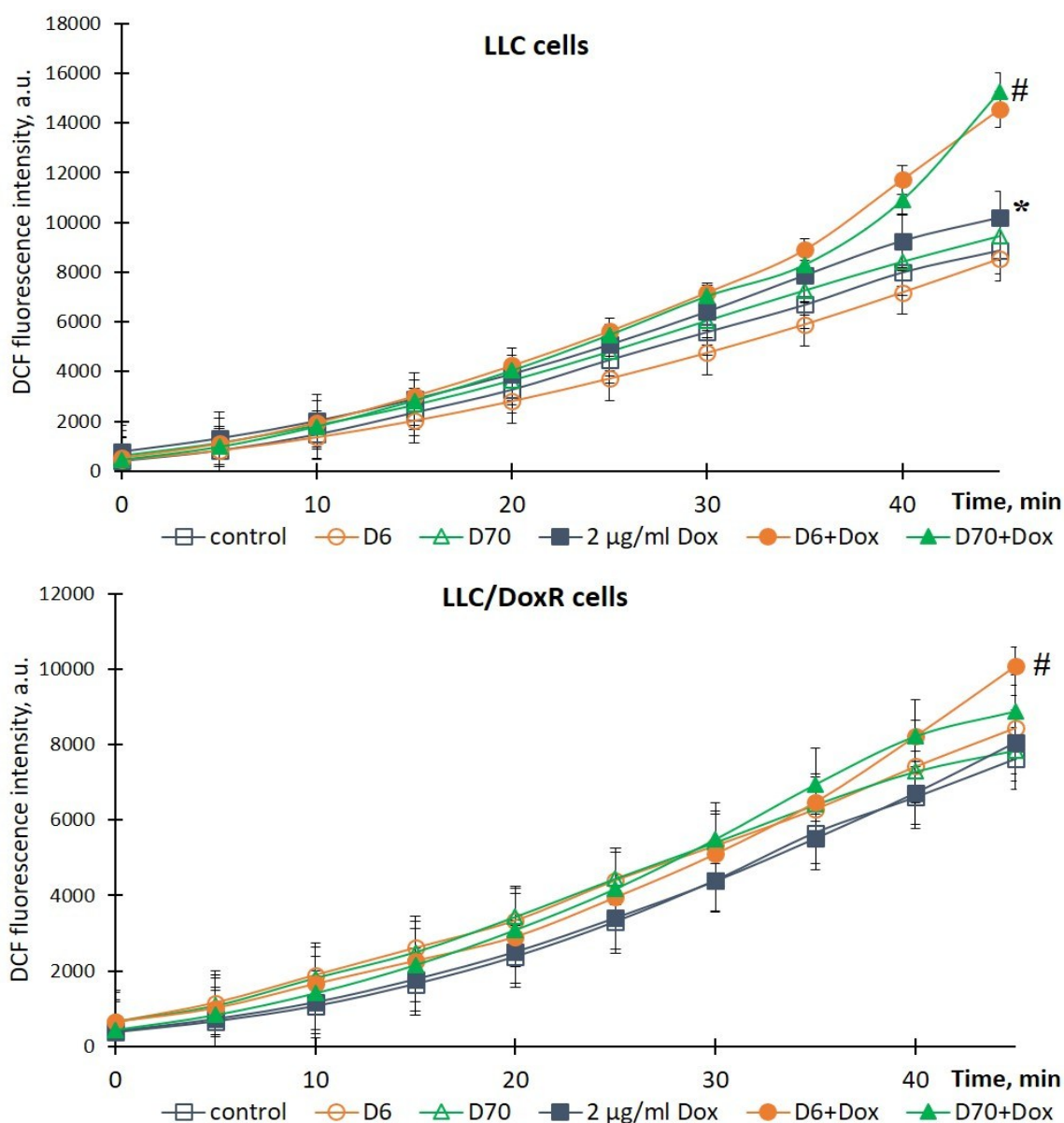


Рис. 3.28. Динаміка продукування АФК у клітинах LLC та LLC/DoxR через 18 год у контролі, за дії вільного Dox (2 µg/ml) або у складі водорозчинних комплексів D6- або D70-g-PNIPAM+Dox в еквівалентній концентрації цитостатику ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p < 0,05$ порівняно з дією вільного Dox за еквівалентної концентрації.

Зазначимо, що продукування АФК в обох лініях клітин, як чутливих LLC, так і резистентних LLC/DoxR, значно посилювалося за дії хіміопрепаратів у складі полімерів D6- і D70-g-PNIPAM. Зокрема,

внутрішньоклітинний рівень АФК у клітинах LLC та LLC/DoxR через 18 год після дії D6-g-PNIPAM+Cis зростав на $34\pm 2\%$ та $20\pm 1\%$, відповідно, порівняно з окремою дією Cis, а після дії D70-g-PNIPAM+Cis – на $21\pm 1\%$ та $25\pm 1\%$, відповідно, порівняно з окремою дією Cis за еквівалентної концентрації (рис. 3.27).

Цей показник зростав після дії D6-g-PNIPAM+Dox у клітинах LLC та LLC/DoxR через 18 год на $43\pm 3\%$ та $25\pm 1\%$, відповідно, порівняно з окремою дією Dox, а після дії D70-g-PNIPAM+Dox – на $51\pm 4\%$ та $10\pm 1\%$, відповідно, порівняно з окремою дією Dox за еквівалентної концентрації (рис. 3.28).

Отже, за комплексації хіміопрепаратів (Cis або Dox) з полімерами D(D6 або D70)-g-PNIPAM їх токсичність зростала, про що свідчить підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК у клітинах як LLC, так і LLC/DoxR.

Ефективну протипухлинну дію щодо клітин LLC виявляли обидва комплекси D(D6 або D70)-g-PNIPAM з хіміопрепаратами (Cis або Dox), тоді як щодо клітин LLC/DoxR – лише комплекс D6-g-PNIPAM+Cis.

3.4.3. Вміст АТФ у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis

Мітохондрії відіграють важливу роль в індукції апоптозу і є внутрішньоклітинними мішенями для цитостатиків, які спричиняють окисне ушкодження мітохондрій [97,98]. Тому ми оцінили вплив досліджуваних сполук на утворення АТФ як основу функціонування мітохондрій.

Показано, що лише за дії 2 $\mu\text{г/мл}$ Dox рівень АТФ знижувався у клітинах LLC, тоді як за інших експериментальних умов – дії 20 $\mu\text{г/мл}$ Cis та на резистентній лінії клітин, досліджуваний показник відповідав контрольним значенням або значно зростав (рис. 3.29). Ці результати можуть свідчити про порушення структурної цілісності та дисфункціонування мітохондрій [99,100].

Значне зниження рівня АТФ спостерігали після дії D6-g-PNIPAM+Cis через 24 год на клітини LLC та LLC/DoxR на $26\pm 1\%$ та $23\pm 1\%$, відповідно,

порівняно з окремою дією Cis за еквівалентної концентрації та D6-g-PNIPAM+Dox на $20\pm 1\%$ у клітинах LLC порівняно з окремою дією Dox за еквівалентної концентрації. Після обробки клітин LLC і LLC/DoxR D70-g-PNIPAM+Cis або D70-g-PNIPAM+Dox цей показник не змінювався (рис. 3.29).

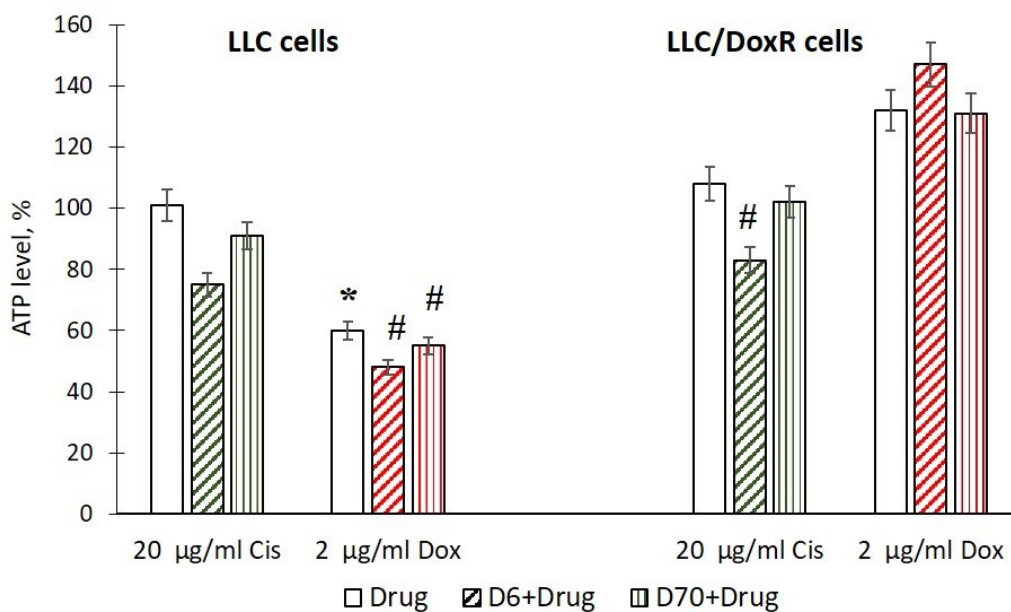


Рис. 3.29. Рівень АТФ у клітинах LLC та LLC/DoxR через 24 год у контролі, за дії вільного хіміопрепарату, Cis (20 µг/мл) та Dox (2 µг/мл), або у складі водорозчинних комплексів D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Cis або Dox в еквівалентній концентрації хіміопрепарату ($M\pm m$, $n=5$). * $p<0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p<0,05$ порівняно з дією вільного хіміопрепарату за еквівалентної концентрації.

Отже, значне посилення цитотоксичного ефекту хіміопрепаратів на рівні мітохондрій спостерігали за комплексоутворення з полімером D6-g-PNIPAM.

3.4.4. Активність каспази 3/7 у клітинах LLC за дії комплексів полімеру D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis

Наступним завданням було з'ясувати механізми цитотоксичної дії досліджуваних сполук шляхом індукції апоптозу. Для цього ми дослідили активність кінцевої протеази каспази 3/7, яка активується за каспазозалежного апоптозу [101].

Показано, що після дії хіміопрепаратів через 24 год інкубації клітин LLC і LLC/DoxR значно підвищувалася активність ферменту, а саме вдвічі і 1,7 рази за дії 20 $\mu\text{г/мл}$ Cis та у 5,7 разів і 1,27 рази за дії 2 $\mu\text{г/мл}$ Dox, відповідно, відносно необроблених контрольних клітин (рис. 3.30).

Автори [102] виявили посилення активності каспази-3 у пухлинних клітинах HepG2 Huh7 і HeLa через 36 год після дії 1 $\mu\text{г/мл}$ Dox. У роботі [103] продемонстровано розщеплення каспази 3 у клітинах A549 раку легені після дії 25 $\mu\text{г/мл}$ Cis.

Ми не виявили посилення активності каспази 3/7 через 24 год після дії водорозчинних полімерів D(D6 або D70)-g-PNIPAM у клітинах LLC та LLC/DoxR (дані не наведено). Тоді як у клітинах LLC після дії D6-g-PNIPAM+Cis і D6-g-PNIPAM+Dox активність каспази 3/7 зростала на $28\pm 2\%$ і $34\pm 2\%$, відповідно, порівняно з окремою дією хіміопрепаратів за еквівалентної концентрації та D70-g-PNIPAM+Cis і D70-g-PNIPAM+Dox – на $38\pm 3\%$ і лише $15\pm 1\%$, відповідно, порівняно з окремою дією хіміопрепаратів за еквівалентної концентрації (рис. 3.30).

Нарешті, у резистентних клітин LLC/DoxR не виявлено посилення концентраційно-залежної каспазної активності, спричиненої Cis і Dox за комплексоутворення з водорозчинними полімерами D(D6 або D70)-g-PNIPAM (рис. 3.30).

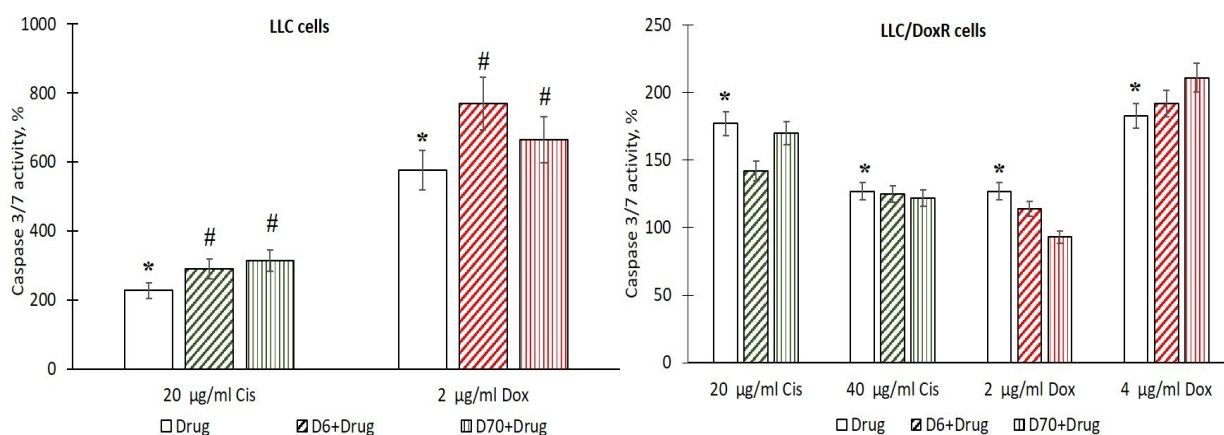


Рис. 3.30. Активність каспази 3/7 у клітинах LLC через 24 год у контролі, за дії вільного хіміопрепарату, Cis (20 µг/мл) та Dox (2 µг/мл), або у складі водорозчинних комплексів D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Cis або Dox в еквівалентній концентрації хіміопрепарату ($M \pm m$, $n=5$); активність каспази 3/7 у клітинах LLC/DoxR через 24 год у контролі, за дії вільного хіміопрепарату, Cis (20 і 40 µг/мл) та Dox (2 і 4 µг/мл), або у складі водорозчинних комплексів D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Cis або Dox в еквівалентній концентрації хіміопрепарату ($M \pm m$, $n=5$). * $p < 0,05$ порівняно з контролем (клітини без добавок); # $p < 0,05$ порівняно з дією вільного хіміопрепарату за еквівалентної концентрації.

Отже, порівняльний аналіз показав, що цитотоксична дія комплексів Cis і Dox з полімерами D(D6 або D70)-g-PNIPAM є ефективнішою, ніж хіміопрепаратів окремо. Більш виразні цитотоксичні ефекти спостерігали за дії комплексів D6-g-PNIPAM+Cis і D6-g-PNIPAM+Dox щодо чутливих, так і резистентних клітин лінії LLC, про що свідчило зниження життєздатності клітин, підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, зниження вмісту АТФ та посилення активності каспази 3/7 порівняно з окремою дією цих цитостатиків за еквівалентної концентрації.

3.4.5. Внутрішньоклітинна локалізація комплексу D-g-PNIPAM+Dox у клітинах HeLa

Для розуміння ефектів цитотоксичної дії полімерів та їх комплексів з хіміопрепаратами важливим є вивчення механізмів проникнення та внутрішньоклітинну локалізацію досліджуваних сполук. З цією метою за використання конфокальної мікроскопії було досліджено проникнення комплексу D70-g-PNIPAM+Dox та внутрішньоклітинну локалізацію у клітинах HeLa. Як флуоресцентну мітку використано Dox [80,104].

На рис. 3.31 представлено результати проникнення та розподіл частинок D70-g-PNIPAM+Dox у клітинах HeLa через 24 год інкубації.

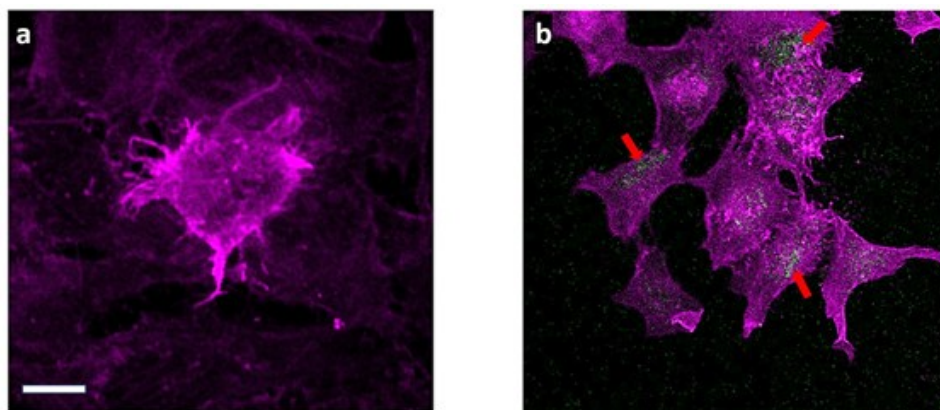


Рис. 3.31. Зображення конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії клітин HeLa: (a) - контрольні (необроблені) та (b) - після 24 год інкубації з частинками D70-g-PNIPAM+Dox (25+1 µg/ml). Стрілки вказують на накопичення наночастинок всередині пухлинних клітин. Фарбування актину (пурпуровий колір), ядер (синій колір) і частинок (зелений колір). Масштабна шкала 10 µm.

Таким чином, оскільки частинки D70-g-PNIPAM не спричиняли токсичної дії як на пухлинні, так і на нормальні клітини, можна запропонувати їх використання як таргентних (цільових) носіїв протипухлинних препаратів, наприклад Dox.

Важливо відзначити, що токсичність Dox є одним з основних факторів, який обмежує його використання в експериментальній онкології. Оскільки токсична дія на системи важливих органів життєдіяльності людини і тварин (наприклад, кровотворна, дихальна, травна, судинна, сечовидільна тощо) є дозо-залежною і значно посилюється за високих кумулятивних доз, тому протипухлинна активність Dox не може бути реалізована у повній мірі. Відтак, включення Dox до структури D70-g-PNIPAM дозволяє не тільки оптимізувати його протипухлинну дію, але й підвищити діючу дозу препарату. Крім того, водорозчинний полімер D70-g-PNIPAM сильно чутливий до температури середовища [61]. Отже, можна припустити, що потрапляючи в патологічні ділянки з підвищеною температурою (~37 °C), частинки D70-g-PNIPAM зазнають конформаційної перебудови і, таким чином, вивільняють ліки локально.

Підсумовуючи, частинки D(D6 або D70)-g-PNIPAM+Dox (або Cis) знижують життєздатність клітин HeLa, LLC і LLC/DoxR порівняно з окремою дією хіміопрепаратів за еквівалентної концентрації. Цитотоксична дія D-g-PNIPAM+хіміопрепарат реалізується апоптоз-залежним шляхом, про що свідчило підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, зниження вмісту АТФ та активації каспази 3/7. За використання конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії доведено *in vitro* поглинання наночастинок D-g-PNIPAM+Dox у клітинах HeLa. Отримані результати вказують на використання полімеру D-g-PNIPAM як безпечної водорозчинної платформи для доставки ліків і, зокрема нанокомплексів D-g-PNIPAM+хіміопрепарат, як ефективних протиракових засобів, що потребує подальших їх доклінічних випробувань.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

В рамках виконання дисертаційної роботи створено нові водорозчинні протипухлинні препарати на основі рН- і термо-чутливих розгалужених полімерів, D-g-PAAan і D(D6 або D70)-g-PNIPAM, відповідно, які містять молекули Dox та Cis, що підтверджено даними FTIR і DLS спектроскопії.

За використання МТТ-тесту та аналізу живі/мертві клітини не виявлено токсичної дії водорозчинних частинок полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM на нормальні (HEK293 та HEL299) та пухлинні клітини (MC3T3, A549, HeLa, LLC та LLC/DoxR) у досліджуваних концентраціях, що свідчить про перспективність їх використання як безпечної наноплатформи для доставки протипухлинних ліків.

За використання поєднаних методів ВРХ та мас-спектрометрії (HPLC-ESI-MS/MS) показано, що полімерна матриця D-g-PAAan, яка містила Dox або Cis, вивільняла хіміопрепарат у відповідь на зниження рН середовища до 5,0 (модель пухлинного сайту), що вказує на можливість його цільової доставки, викликаній зміною рН.

За використання конфокальної мікроскопії продемонстровано поглинання частинок D-g-PAAan+Dox та D-g-PNIPAM+Dox пухлинними клітинами MC3T3 та HeLa.

Виявлено концентраційно- та часозалежне посилення токсичних ефектів цитостатиків Dox або Cis у складі полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM у досліджуваних системах *in vitro*. Так, частинки D-g-PAAan значно підвищували токсичний потенціал хіміопрепаратів Dox та Cis у їх складі щодо клітин карциноми легень людини та миші (A549 та LLC), але не щодо нормальних клітин легень людини (HEL299). Навантажені хіміопрепаратом (Dox або Cis) частинки D-g-PAAan сприяли подальшому окисному стресу та індукції апоптозу у клітинах LLC шляхом підвищення внутрішньоклітинного продукування АФК та активності каспази 3/7. Виявлені селективні цитотоксичні ефекти протипухлинних препаратів Dox і

Cis за їх інкапсуляції у полімерну матрицю D-g-PAAan свідчать про диференціацію взаємодії між створеними комплексами та пухлинними і нормальними клітинами, відповідно, що підтверджує перспективність їх використання у протипухлинній терапії.

Посилення внутрішньоклітинного накопичення Dox при транспортуванні у складі полімеру D-g-PAAan та модулюючий ефект цитотоксичності хіміотерапевтичних препаратів Dox і Cis у складі полімеру D-g-PAAan, підтверджені на 3D сфероїдній моделі клітин LLC, свідчать про перспективність застосування водорозчинних частинок полімеру D-g-PAAan для цільової доставки хіміопрепаратів у системи *in vivo*.

Цитотоксична дія Dox і Cis у складі комплексів полімерів D(D6 або D70)-g-PNIPAM є значно ефективнішою, ніж їхня токсична дія окремо щодо чутливих і резистентних до Dox клітин лінії LLC, про що свідчило підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, зниження вмісту АТФ та посилення активності каспази 3/7 порівняно з окремою дією цих цитостатиків за еквівалентної концентрації.

Встановлено, що токсичність Cis у комплексах D(D6 або D70)-g-PNIPAM щодо клітин LLC підвищується за низьких концентрацій хіміопрепарату. Крім того, чутливість клітин LLC/DoxR до дії досліджуваних комплексів полімерів D(D6 або D70)-g-PNIPAM з хіміопрепаратами була вищою порівняно з чутливими клітинами LLC, що свідчить про посилення цитотоксичних ефектів хіміопрепаратів полімерами та модифікацію процесів стійкості у клітин до цитостатиків.

Токсична дія поглинених клітинами HeLa частинок D70-g-PNIPAM+Dox значно зростала зі збільшенням концентрації Dox. Оскільки водорозчинний полімер D70-g-PNIPAM сильно чутливий до температури середовища, можна припустити, що потрапляючи у патологічні ділянки з підвищеною температурою (~37 °C), частинки D70-g-PNIPAM зазнаватимуть конформаційної перебудови і, таким чином, вивільнятимуть ліки локально. Відтак, включення Dox до структури D70-g-PNIPAM дозволяє не лише

оптимізувати його фармакокінетику, але й підвищити діючу концентрацію препарату.

Таким чином, одержані вперше результати свідчать про те, що запропонована стратегія інкапсуляції протипухлинних препаратів у полімерні матриці D-g-PAAan і D-g-PNIPAM дозволяє не лише реалізувати відповідне рН- і термо-таргентне вивільнення хіміопрепаратів, але й посилити їх токсичну, прооксидантну та проапоптотичну дії на пухлинні клітини, що потребує подальших доклінічних випробувань.

ВИСНОВКИ

Відповідно до мети та поставлених завдань дослідження можна сформулювати такі основні висновки:

1. створено нові комплекси рН- (D-g-PAAan) і термо- (D-g-PNIPAM) чутливих полімерів з протипухлинними препаратами Dox і Cis та за використання методів інфрачервоної спектроскопії і динамічного розсіювання світла доведено їх стабільність у водному середовищі;

2. за використання методів високоефективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії продемонстровано здатність полімеру D-g-PAAan ефективно вивільняти хіміопрепарати Dox і Cis у відповідь на зниження рН середовища до 5,0 (модель пухлинного сайту);

3. за використання конфокальної мікроскопії продемонстровано здатність комплексів D-g-PAAan+Dox та D-g-PNIPAM+Dox проникати у пухлинні клітини MC3T3 (клітинна лінія остеобластів миші) та HeLa (трансформовані епітеліальні клітини шийки матки людини);

4. за використання МТТ-тесту та аналізу живі/мертві клітини встановлено часо- та концентраційнозалежне посилення токсичної дії комплексів полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis на лініях пухлинних клітин A549 (клітини карциноми легені людини) та LLC (клітини карциноми легені миші) порівняно з окремою дією хіміопрепаратів за еквівалентної концентрації;

5. показано, що цитотоксична дія комплексів полімерів D-g-PAAan і D-g-PNIPAM з хіміопрепаратами Dox і Cis реалізується шляхом індукції апоптозу, про що свідчило підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, зниження вмісту АТФ та посилення активності каспази 3/7 у пухлинних клітинах LLC.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Quirk RP, Lee Y, Kim J. Synthesis of branched polymers: an introduction. *J Macromol Sci. Part C*. 2001;41(4):369-90. doi:10.1081/mc-100107862
2. Lutz PJ, Peruch F. Graft Copolymers and Comb-Shaped Homopolymers. Chapter: 6.14. In book: *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. 2012:511-42. doi: 10.1016/B978-0-444-53349-4.00172-2
3. Göktaş M. Copolymer Synthesis with Redox Polymerization and Free Radical Polymerization Systems. In book: *Redox*. 2020; doi:10.5772/intechopen.88088
4. Kutsevol N, Harahuts I, Nadтока O, Naumenko A., Yeshchenko O. Hybrid nanocomposites synthesized into stimuli responsible polymer matrices: synthesis and application prospects. 6th International Research and Practice Conference on Nanotechnology and Nanomaterials. *Springer Proceedings in Physics*. 2019;221:167-85.
5. Kutsevol N, Naumenko A, Chumachenko V, Yeshchenko O, Harahuts Yu, Pavlenko V. Aggregation processes in hybrid nanosystem polymer/nanosilver/cisplatin. *Ukr J Phys*. 2018;63(6):513-20. <https://doi.org/10.15407/ujpe63.6.513>
6. Kutsevol N, Naumenko A. Smart Nanocarriers for Delivery of Anticancer Drugs: Recent Advances and Disadvantages. *Springer Proceedings in Physics Nanooptics and Photonics, Nanochemistry and Nanobiotechnology, and Their Application*. 2020;247:129-40.
7. Kutsevol N, Kuziv Yu, Bezugla T, Chumachenko V, Chekhin V. Multicomponent Nanocomposites for Complex Anticancer Therapy: Effect of Aggregation Processes on Their Efficacy. *Int J Polymer Sci*. 2020; 2020: 9627954. <https://doi.org/10.1155/2020/9627954>
8. Brittain WJ, Minko SJ. A Structural Definition of Polymer Brushes. *Polym Sci. Part A: Polym. Chem*. 2007;45:3505. <https://doi.org/10.1002/pola.22180>

9. Patra JK, Das G, Fraceto LF. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol.* 2018;16:71. doi:10.1016/j.addr.2006.09.020
10. Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2006;58(15):1655-70.
11. Jun L, Bochu W, Yazhou W. Thermo-sensitive Polymers for Controlled-release Drug Delivery Systems. *Int J Pharmacol.* 2006;2:513-9.
12. Zarrintaj P, Jouyandeh M, Ganjali M, Shirkavand HB, Mozafari M, Sheiko S, Vatankhah-varnoosfaderani M, Gutiérrez T, Saeb MR. Thermo-sensitive polymers in medicine: A review. *Eur Polymer J.* 2019;117:402-423.
13. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-49. doi: 10.3322/caac.21660
14. Rani K, Paliwal S. A Review on Targeted Drug Delivery: Its Entire Focus on Advanced Therapeutics and Diagnostics. *Scholars J Appl Med Sci.* 2014;2:328-31. doi: 10.46624/ajptr.2018.v8.i4.001
15. Shivappa NN, Rajan WD, Mayuri CJ, Rohini BV, Swamy VSM. A Review On Targeted Drug Delivery. *Am J Pharm Tech Res.* 2018;8(4):1-11. doi: 10.46624/ajptr.2018.v8.i4.001
16. Yin H, Liao L, Fang J. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting: The Concept, Application and Prospect. *JSM Clin Oncol Res.* 2014;2(1):1010. doi: 10.1038/s41467-018-03705-y
17. Rosenblum D, Joshi N, Tao W. et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat Commun.* 2018;9:1410. doi: 10.7150/thno.49577
18. Shi Y, Van der Meel R, Chen X, Lammers T. The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics.* 2020;10(17):7921-4. <https://doi.org/10.7150/thno.37198>

19. Park J, Choi Y, Chang H, Um W, Ryu JH, Kwon IC. Alliance with EPR Effect: Combined Strategies to Improve the EPR Effect in the Tumor Microenvironment. *Theranostics*. 2019;9(26):8073-90. <https://doi.org/10.7150/thno.37198>
20. Gradishar WJ. et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7794-803.
21. Lancet JE. et al. Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7 + 3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML. *J Clin Oncol*. 2016;34:7000. <https://doi.org/10.1002/adfm.201901001>
22. Cook AB, Perrier S, Branched, Dendritic Polymer Architectures: Functional Nanomaterials for Therapeutic Delivery. *Adv Funct Mater*. 2020;30:1901001.
23. Kakkar A, Traverso G, Farokhzad OC, Weissleder R, Langer R. Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems. *Nat Rev Chem*. 2017;1:0063.
24. Polymeropoulos G, Zapsas G, Ntetsikas K, Bilalis P, Gnanou Y, Hadjichristidis N. 50th Anniversary Perspective: Polymers with Complex Architectures. *Macromolecules*. 2017;50:1253.
25. Voit BI, Lederer A. Hyperbranched and Highly Branched Polymer Architectures—Synthetic Strategies and Major Characterization Aspects. *Chem Rev*. 2009;109:5924.
26. Choi J, Rubner MF. Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly. *Macromolecules*. 2005;38:116-24.
27. Tavagnacco L, Zaccarelli E, Chiessi E. On the molecular origin of the cooperative coil-to-globule transition of poly(N-isopropylacrylamide) in water. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(15):9997-10010. [doi:10.1039/c8cp00537k](https://doi.org/10.1039/c8cp00537k)
28. Bordat A, Boissenot T, Nicolas J, Tsapis N. Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications. *Adv Drug Delivery Reviews*. 2018; [doi:10.1016/j.addr.2018.10.005](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.005)

29. Maccio A, Madeddu C. Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy - from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(13):1839-57.
30. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J. et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007;7(1):3-18.
31. Galluzzi L, Vitale I, Michels J. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2014;5(5):1-18.
32. Shah N, Dizon DS. New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncol*. 2009;5:33-42.
33. Zhang J, Wang L, Xing Z, Liu D, Sun J, Li X, Zhang Y. Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010;10:272-82.
34. Momekov G, Ferdinandov D, Bakalova A, Zaharieva M, Konstantinov S, Karaivanova M. *In vitro* toxicological evaluation of a dinuclear platinum(II) complex with acetate ligands. *Arch Toxicol*. 2006;80:555-60.
35. Günes DA, Florea AM, Splettstoesser F, Büsselberg D. Co-application of arsenic trioxide (As_2O_3) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and cytotoxicity. *Neurotoxicology*. 2009;30:194-202.
36. Keller GA, Ponte ML, Di Girolamo G. Other drugs acting on nervous system associated with QT-interval prolongation. *Curr Drug Saf*. 2010;5:105-11.
37. Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *Eur J Pharmacol*. 2006;532:290-3.
38. Longchar A, Prasad SB. Ascorbic acid (vitamin C) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in tumor-bearing mice. *World J Pharmacy Pharmaceutical Sci*. 2016;5:1870-91.
39. Florea A-M, Buesselberg D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):1351-71. doi:10.3390/cancers3011351

40. Rebillard A, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel M-T. [et al.] Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Curr Med Chem.* 2008;15(26):2656-63.
41. Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodiversity.* 2010;7(3):543-66.
42. Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(4):347-59.
43. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S. et al. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1806(2):172-82.
44. Jacobsen C, Honecker F. Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms. *Andrology.* 2015;3(1):111-21.
45. Virych PA, Zadvorniy TV, Borikun TV, Lykhova OO, Chumachenko VA, Virych PA, Pavlenko VA, Kutsevol NV, Lukianova NY. Effects of dextran-graft-polyacrylamide/ZnO nanoparticles on prostate cancer cell lines in vitro. *Experimental Oncology.* 2022;44(3):217-21. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-3.18452>
46. Kurczewska J. Recent Reports on Polysaccharide-Based Materials for Drug Delivery. *Polymers.* 2022;14:4189. <https://doi.org/10.3390/polym14194189>
47. Chumachenko V, Virych P, Nie G, Virych P, Yeshchenko O, Khort P, Tkachenko A, Prokopiuk V, Lukianova N, Zadvorniy T, Rawiso M, Ding L, Kutsevol N. Combined Dextran-Graft-Polyacrylamide/Zinc Oxide Nanocarrier for Effective Anticancer Therapy in vitro. *Int J Nanomed.* 2023;18:4821-38. <https://doi.org/10.2147/IJN.S416046>
48. Virych PA, Chumachenko VA, Virych PA, Pavlenko VO, Kutsevol NV. Cytotoxicity of dextran-graft-polyacrylamide/zinc oxide nanoparticles against doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Ukr Biochem J.* 2023;95(6):73-80. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.073>

49. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(7):727-41.
50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/>
51. Roychoudhury S, Kumar A, Bhatkar D, Sharma NK. Molecular avenues in targeted doxorubicin cancer therapy. *Future Oncol.* 2020;16(11):687-700. doi: 10.2217/fon-2019-0458.
52. Pereira GC, Silva AM, Diogo CV, Carvalho FS, Monteiro P, Oliveira PJ. Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. *Curr Pharm Des.* 2011;17(20):2113-29.
53. Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM. Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 1980;597(1):1-14.
54. Telegeev G, Kutsevol N, Chumachenko V et al. Dextran-Polyacrylamide as Matrices for Creation of Anticancer Nanocomposite. *Int J Polymer Sci.* 2017;1(9):4929857. doi:10.1155/2017/4929857
55. Kutsevol N, Kuziv Yu, Bezugla T et al. Application of new multicomponent nanosystems for overcoming doxorubicin resistance in breast cancer therapy. *Applied Nanoscience (Switzerland).* 2021;12(3):427-37. doi: 10.1007/s13204-020-01653-y
56. Yeshchenko OA., Kutsevol NV, Tomchuk AV et al. Dextran-graft-PNIPAM / Au nanoparticles / perylenediimide hybrid system as thermosensitive optical switches and fluorescent labels for potential use in nanophotonics and biomedical applications. *Optical Materials.* 2022;131(6):112753. doi: 10.1016/j.optmat.2022.112753
57. Vashchenko OV, Berest VP, Sviechnikova LV et al. Modifying Membranotropic Action of Antimicrobial Peptide Gramicidin S by Star-like Polyacrylamide and Lipid Composition of Nanocontainers. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16):8691. <https://doi.org/10.3390/ijms25168691>

58. Yeshchenko O, Kutsevol N, Virych P et al. Anti-cancer activity of zinc-tetraphenylporphyrin photosensitizer/dextran-graft-polyacrylamide copolymer/Au(Ag) nanoparticle nanohybrids. RSC Advances. 2024;14(8):5045-47.
59. Kutsevol N, Bezugla T, Bezuglyi M, Rawiso M. Branched dextran-graft-polyacrylamide copolymers as perspective materials for nanotechnology. Macromol Symp. 2012;317-318:82-9.
60. Kutsevol N, Bezuglyi M, Rawiso M. Star-like dextran-graft-(polyacrylamide-co-polyacrylic acid) copolymers. Macromol Symp. 2014;335:12-26.
61. Chumachenko V, Kutsevol N, Harahuts Yu, Rawiso M, Marinin A, Bulavin L. Star-like Dextran-graft-PNiPAM copolymers. Effect of internal molecular structure on the phase transition. J Mol Liq. 2017;235:77-82. doi: 10.1016/j.molliq.2017.02.098
62. Adams RP. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier. 1990.
63. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 1987;47(4):936-42.
64. Grebinyk A, Prylutska S, Grebinyk S, Prylutsky Y, Ritter U, Matyshevska O, Dandekar T, Frohme M. Complexation with C₆₀ Fullerene Increases Doxorubicin Efficiency against Leukemic Cells *In Vitro*. Nanoscale Res Lett. 2019;14(1):61.
65. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol. 1992;5:227-231.
66. Прилуцький Ю.І., Ільченко О.В., Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Статистичні методи в біології. – К.: Наукова думка, 2017. – 216 с.
67. Yang X, Zhang X, Liu Z, Huang Y, Chen Y. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on grapheme oxide. J Phys Chem C. 2008;112:17554-8.

68. Wang Y, Liu Q, Qiu L, Wang T, Yuan H, Lin J, et al Molecular structure, IR spectra, and chemical reactivity of cisplatin and transplatin: DFT studies, basis set effect and solvent effect. *Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectr.* 2015;150:902-8.
69. Nayak BR, Singh RP. Synthesis and characterization of grafted hydroxypropyl guar gum by ceric ion induced initiation. *Eur Polymer J.* 2001;37:1655-66.
70. Kiatkamjornwong S, Chomsaksakul W, Sonsuk M. Radiation modification of water absorption of cassava starch by acrylic acid/acrylamide. *Rad Phys Chem.* 2000;59:413-27.
71. Tolkachov M, Sokolova V, Korolovych V, Prylutsky Yu, Epple M, Ritter U, Scharff P. Study of biocompatibility effect of nanocarbon particles on various cell types *in vitro*. *Mat-wiss u Werkstofftech.* 2016;47:216-221.
72. Gurunathan S, Kang M-H, Qasim M, Kim J-H. Nanoparticle-mediated combination therapy: two-in-one approach for cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19:3264.
73. Xu Y, Shan Y, Cong H, Shen Y, Yu B. Advanced carbon-based nanoplateforms combining drug delivery and thermal therapy for cancer treatment. *Curr Pharm Des.* 2018;24:4060-76.
74. Bhattarai P, Hameed S, Dai Z. Recent advances in anti-angiogenic nanomedicines for cancer therapy. *Nanoscale.* 2018;10:5393-423.
75. Singla R, Sharma C, Shukla AK. Toxicity concerns of therapeutic nanomaterials. *J Nanosci Nanotechnol.* 2019;19:1889-907.
76. Chen KL, Elimelech M. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Langmuir.* 2006;22(26):10994-1001.
77. Song M, Liu Sh, Yin J, Wang H. Interaction of Human Serum Album and C₆₀ Aggregates in Solution. *Int J Mol Sci.* 2011;12(8):4964-74. <https://doi.org/10.3390/ijms12084964>
78. Shaoling W, Xindong Z, Yanhui L, Qiuju D, Jiankun S, Yonghao W, Xin W, Yanzhi X, Zonghua W, Linhua X. Adsorption Properties of Doxorubicin

Hydrochloride onto Graphene Oxide: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies. *Materials*. 2013;6:2026-42.

79. Borowik A, Butowska K, Konkel K, Banasiuk R, Derewońko N, Wyrzykowski D, Davydenko M, Cherepanov V, Styopkin V, Prylutsky Yu, Pohl P, Królicka A, Piosik J. The impact of surface functionalization on the biophysical properties of silver nanoparticles. *Nanomaterials*. 2019;9:973. doi: 10.3390/nano9070973
80. Prylutsky Y, Bychko A, Sokolova V, Prylutska S, Evstigneev M, Rybalchenko V, et al Interaction of C₆₀ fullerene complexed to doxorubicin with model bilipid membranes and its uptake by HeLa cells. *Mater Sci Engineer C*. 2016;59:398-403.
81. Nurcahyanti ADR, Wink M. L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(2):206-11.
82. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(12):931-47.
83. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E., Giovannelli P, Galasso G, Castoria G, Migliaccio A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*. 2020;52(2):192-203.
84. Kalivendi SV, Konorev EA, Cunningham S, Vanamala SK, Kaji EH, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J*. 2005;389(2):527-39.
85. Kleih M, Böpple K, Dong M, Gaißler A, Heine S, Olayioye MA, Aulitzky WE, Essmann F. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell Death Dis*. 2019;10(11):851.
86. Zhu H, Sarkar S, Scott L, Danelisen I, Trush MA, Jia Z, Li YR. Doxorubicin Redox Biology: Redox Cycling, Topoisomerase Inhibition, and Oxidative Stress. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016;1(3):189-98.

87. Wangpaichitr M, Wu C, Li YY, Nguyen DJM, Kandemir H, Shah S, Chen S, Feun LG, Prince JS, Kuo MT, Savaraj N. Exploiting ROS and metabolic differences to kill cisplatin resistant lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8:49275-92. doi: 10.18632/oncotarget.17568
88. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000;5(5):415-8.
89. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;1(12):207-18.
90. Prylutska SV, Grynyuk II, Skaterna TD, Horak IR, Grebinyk AG, Drobot LB, Matyshevskaya OP, Senenko AI, Prylutsky YuI, Naumovets AG, Ritter U, Frohme M. Toxicity of C₆₀ fullerene-cisplatin nanocomplex against Lewis lung carcinoma cells. *Arch Toxicol*. 2019;93(5):1213-26.
91. Sarin N, Engel F, Kalayda GV, Mannewitz M, Cinatl JJr, Rothweiler F, Michaelis M, Saafan H, Ritter CA, Jaehde U, Frotschl R. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0181081. doi: 10.1371/journal.pone.0181081
92. Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS. Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect *in vitro*. *Mol Cancer*. 2003;2:1.
93. Kashkin K.N, Musatkina EA, Komelkov AV, Favorskaya IA, Trushkin EV, Shleptsova VA, Sakharov DA, Vinogradova TV, Kopantzev EP, Zinovyeva MV, Kovaleva OV, Zborovskaya IB, Tonevitsky AG, Sverdlov ED. Expression profiling and putative mechanisms of resistance to doxorubicin of human lung cancer cells. *Doklady Biochem Biophys*. 2010;430(1):20-3. doi: 10.1134/S1607672910010072
94. Al-Temimay IA, AL-Jibouri MH, Hassan AA, Mohammad FI. Test the Cytotoxicity of Pleurotin Extracted from an Edible Mushroom *Pleurotus*

- osteratus Against Three Human Carcinoma Cell Line. *Iraqi J Sci.* 2015;56(4A):2773-81.
95. Lv Y, Huo Y, Yu X, Liu R, Zhang S, Zheng X, Zhang X. TopBP1 contributes to the chemoresistance in non-small cell lung cancer through upregulation of p53. *Drug Design, Development and Therapy.* 2016;10:3053-64. doi: 10.2147/DDDT.S90705
 96. Itoh T, Terazawa R, Kojima K, Nakane K, Deguchi T, Ando M, Tsukamasa Y, Ito M, Nozawa Y. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. *Free Radic Res.* 2011;45(9):1033-9.
 97. Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro.* 2008;22(1):232-9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.006>
 98. Shin DH, Choi Y-J, Park J-W. SIRT1 and AMPK Mediate Hypoxia-Induced Resistance of Non-Small Cell Lung Cancers to Cisplatin and Doxorubicin. *Cancer Res.* 2014;74(1):298-308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2620
 99. Szklarczyk R, Nooteboom M, Osiewicz HD. Control of mitochondrial integrity in ageing and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1646):20130439. doi: 10.1098/rstb.2013.0439
 100. Hoogstraten CA, Lyon JJ, Smeitink JAM, Russel FGM, Schirris TJJ. HA3BA Pharmacological Reviews. 2023;75(3):463-86. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.122.000568>.
 101. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology.* 2013;14:32-41.
 102. Hu K-Q, Deng F, Hu X-P, Zhang W, Zeng X-C, Tian X-F. Histone deacetylase SIRT6 regulates chemosensitivity in liver cancer cells via modulation of FOXO3 activity. *Oncology Reports.* 2018;40:3635-44.

103. Rabik CA, Fishel ML, Holleran JL, Kasza K, Kelley MR, Egorin MJ, Dolan ME. Enhancement of cisplatin [cis-diammine dichloroplatinum (II)] cytotoxicity by O₆-benzylguanine involves endoplasmic reticulum stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(2):442-52.
104. Grebinyk A, Prylutska S, Chepurna O, Grebinyk S, Prylutsky Yu, Ritter U, Ohulchansky TY, Matyshevska O, Dandekar T, Frohme M. Synergy of chemo- and photodynamic therapies with C₆₀ fullerene-doxorubicin nanocomplex. *Nanomater*. 2019;9(11):1540. doi: 10.3390/nano9111540

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в іноземних виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus:

1. Yurchenko A, Nikitina N, Sokolova V, Prylutska S, Kuziv Yu, Virych P, Chumachenko V, Kutsevol N, **Ponomarenko S**, Prylutskyu Yu, Epple M. A novel branched copolymer - containing anticancer drug for targeted therapy: *in vitro* research. **BioNanoSci.**, 2020, V. 10, N 1, P. 249-259. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00700-5> **(Q3)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*
2. Chernykh M, Zavalny D, Sokolova V, **Ponomarenko S**, Prylutska S, Kuziv Yu, Chumachenko V, Marynin A, Kutsevol N, Epple M, Ritter U, Piosik J, Prylutskyu Yu. A new water-soluble thermosensitive star-like copolymer as a promising carrier of the chemotherapeutic drug doxorubicin. **Mater.**, 2021, V. 14, N 13: 3517. Doi: 10.3390/ma14133517 **(Q2)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*
3. Grebinyk A, Prylutska S, Grebinyk S, **Ponomarenko S**, Virych P, Chumachenko V, Kutsevol N, Prylutskyu Yu, Ritter U, Frohme M. Drug delivery with pH-sensitive star-like dextran-graft polyacrylamide copolymer. **Nanoscale Adv.**, 2022, V. 4, N 23, P. 5077-5088. <https://doi.org/10.1039/D2NA00353H> **(Q1)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*
4. Prylutska S, Grebinyk A, **Ponomarenko S**, Gövem D, Chumachenko V, Kutsevol N, Petrovsky M, Ritter U, Frohme M, Piosik J, Prylutskyu Yu. Toxicity of water-soluble D-g-PNIPAM polymers in a complex with chemotherapy drugs and mechanism of their action *in vitro*. **Int. J. Mol. Sci.**, 2024, V.25, N 5: 3069. Doi: 10.3390/ijms25053069 **(Q1)** *(Дисертант брав участь в опрацюванні літературних даних, експериментальній частині роботи, аналізі та*

обговоренні результатів, написанні статті)

Апробація результатів досліджень на наукових конференціях:

1. **Ponomarenko S**, Kuziv Yu, Sokolova V, Virych P, Chumachenko V, Kutsevol N, Prylutsky Yu, Ritter U, Epple M. Cytotoxicity of chemotherapeutic drugs loaded into a pH-sensitive star-like copolymer. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2020)"; 2020: 238, Lviv, Ukraine.
2. **Ponomarenko S**, Grebinnyk A, Prylutska S, Grebinnyk S, Chumachenko V, Kutsevol N, Prylutsky Yu, Frohme M. Drug delivery with pH-sensitive star-like Dextran-Graft Polyacrylamide copolymer. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2022)"; 2022: 239, Lviv, Ukraine.
3. **Ponomarenko S**, Prylutska S, Grebinnyk A, Chumachenko V, Kutsevol N, Frohme M, Prylutsky Yu. Drug delivery with thermosensitive star-like Dextran-graft-Poly-N-iso-Polyacrylamide copolymer. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2023)"; 2023: 289, Lviv, Ukraine.
4. **Ponomarenko S**, Prylutska S, Grebinnyk A, Chumachenko V, Kutsevol N, Ritter U, Frohme M, Prylutsky Yu. *In vitro* toxic effect of water-soluble D-g-PNIPAM polymers in a complex with traditional chemotherapy drugs. Abstract Book, International research and practice conference: "Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2024)"; 2024: 304, Uzhhorod, Ukraine.