

# ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

## ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ПАКЛИТАКСЕЛА

В. Боят, В. Ю. Балабаньян, Р. Н. Аляутдин<sup>1</sup>

Методом соосаждения получена наносомальная форма паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот. Цитотоксическая активность полученной формы изучена на высокорезистентной клеточной линии Jurkat WT (клетки Т-лимфобластного лейкоза человека) с использованием биохимических методов. Установлено, что ингибирующая концентрация ( $ИК_{50}$ ) для экспериментальной формы паклитаксела лежит в диапазоне концентрации  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$  М. Методом флуоресцентной микроскопии выявлено накопление наночастиц в высокорезистентных опухолевых клетках Jurkat WT.

**Ключевые слова:** паклитаксел, наночастицы, *in vitro*, Jurkat

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для химиотерапии злокачественных новообразований используют различные группы цитостатиков. Однако в клинической практике терапевтический эффект не всегда может быть достигнут, что в определенной степени обусловлено множественной лекарственной устойчивостью опухолевых клеток. Одним из механизмов, определяющих резистентность опухолевых клеток к цитостатикам, является система активного выброса препарата из клеток, представленная Р-гликопротеином [5]. С целью преодоления этого барьера увеличивают дозы лекарственных препаратов, что в значительной степени приводит к усугублению побочных эффектов со стороны различных органов и систем. Таким образом, многие цитостатики, являющиеся субстратом Р-гликопротеина, теряют свою клиническую значимость [9].

В этой связи значительный интерес представляет цитостатик из группы таксанов — паклитаксел, подавляющий митоз опухолевых клеток. Паклитаксел широко применяется в онкологии, включен в европейские и российские клинические рекомендации как препарат первой и второй линии при раке молочной железы, яичников и немелкоклеточном раке легкого. Аффинитет к Р-гликопротеину в сочетании с низкой растворимостью субстанции, требующей включения в состав лекарственной формы токсичных солюбилизаторов, создали предпосылки для разработки наносомальной формы паклитаксела. В литературе описаны способы получения микро-, наночастиц с паклитакселом, представлены данные по биологическому изучению наносомальных форм на отдельных моделях злокачественных новообразований *in vitro* и *in vivo* [6, 10, 11]. Одна-

ко в литературе отсутствуют данные по цитотоксической активности наносомального паклитаксела в отношении мультирезистентных опухолевых клеток. В этой связи, значительный интерес представляет изучение наносомальной формы паклитаксела на высокорезистентных клеточных линиях, в частности, на клетках Т-лимфобластного лейкоза человека (JurkatWT). Ранее нами была получена наносомальная форма паклитаксела на основе биodeградируемых и биосовместимых полимеров (сополимеры молочной и гликолевой кислот- poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)), изучено влияние различных технологических параметров на физико-химические свойства паклитаксел-содержащих PLGA-наночастиц [1]. Известно, что включение лекарственных веществ в матрикс наночастиц с последующим покрытием поверхности различными поверхностно-активными веществами, приводит к внутриклеточному накоплению лекарственных веществ, в том числе субстратов Р-гликопротеина [8]. Кроме того, повышенная проницаемость новообразованных капилляров опухоли также приводит к накоплению и выходу наночастиц из сосудистого русла в зону опухолевого роста [4, 13 – 15]. Так, в работах [3, 5] цитотоксический эффект паклитаксел-содержащих наночастиц был продемонстрирован только в присутствии ингибиторов Р-гликопротеина. В связи с этим оправдано включение в состав лекарственной формы поверхностно-активных веществ — ингибиторов Р-гликопротеина, в частности полисорбата 80 (ПС-80).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Приготовление образцов для биологических исследований.* Полученные ранее лиофилизированные образцы наночастиц редиспергировали в воде для инъекций или в 2 % растворе ПС-80 до получения гомогенной суспензии. Исследовали 4 экспериментальных

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии фармацевтического факультета (зав. — проф. Р. Н. Аляутдин) ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.

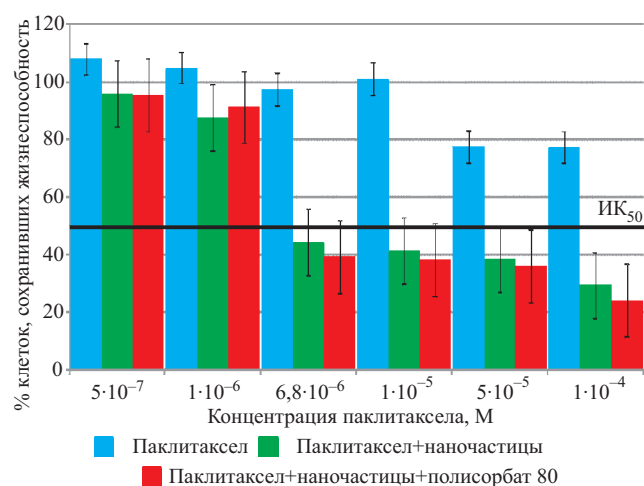


Рис. 1. Цитотоксичность различных форм паклитаксела в МТТ тесте.

формы: паклитаксел, наночастицы (НЧ) + ПС-80, паклитаксел + наночастицы, паклитаксел + НЧ + ПС-80.

**Инкубация клеток.** Клетки Jurkat WT в экспоненциальной фазе роста на питательной среде (90 % RPMI 1640 без глутамина, 10 % FBS-эмбриональная телячья сыворотка, витамины, незаменимые аминокислоты, L-глутамин (“Sigma”, США) пересевали в лунки 96-или 24-луночного планшета (50 – 100 тысяч клеток в лунку), инкубировали в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Через 12 ч инкубации вносили аликвоты исследуемых форм до получения концентраций 10<sup>-4</sup> М – 5 · 10<sup>-7</sup> М паклитаксела (“Calbiochem”, США). Клетки инкубировали в присутствии различных форм паклитаксела при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Контролем служили интактные клетки, инкубированные в аналогичных условиях.

Цитотоксическую активность экспериментальных форм оценивали в трех биохимических тестах.

**МТТ-тест.** В контрольные и опытные образцы клеточных культур за 4 – 6 ч до окончания инкубации вносили по 10 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)2,5-дифенил-2-Н-тетразолия бромид, стоковый раствор 5 мг/мл, “Sigma”, США). По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 – 7 мин. Супернатант отбирали, вносили в каждую лунку по 60 мкл ДМСО (“Sigma”, США); осадки ресуспендировали и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Затем определяли оптическую плотность раствора формазана при длине волны 540 нм (спектрофотометр вертикального сканирования Titertek Multiscan MCC/340 (“Flow Lab.”, США)). Результаты измерения обрабатывали с использованием программы Elisafit.

**ЛДГ-тест (лактат-дегидрогеназный тест).** В контрольные и опытные образцы клеточных культур за 4 – 6 ч до окончания инкубации вносили 100 мкл 0,1 % раствора Тритон X-100 (“Химмед”, Россия). По окончании инкубации клетки осаждали центрифуги-

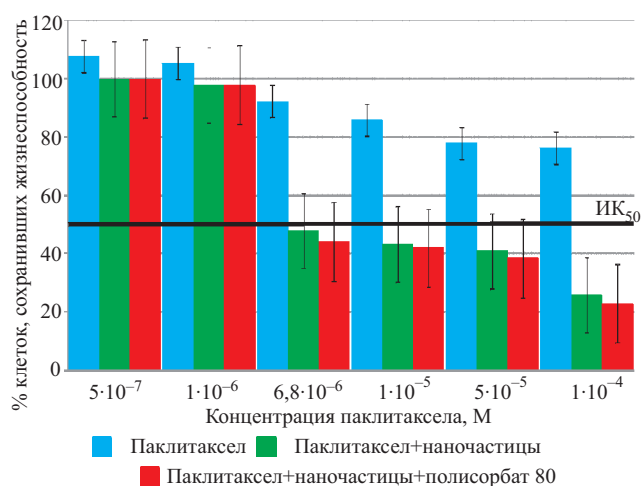


Рис. 2. Цитотоксичность различных форм паклитаксела в ЛДГ тесте.

рованием при 1000 об/мин в течение 5 – 7 мин. Супернатант отбирали, вносили в каждую лунку по 10 мкл соли тетразолия (“Roche”, Швейцария); осадки ресуспендировали и инкубировали 30 мин при 37 °С. Определяли оптическую плотность раствора формазана при длине волны 590 нм.

**АТФ-тест.** В контрольные и опытные образцы клеточных культур за 30 мин до окончания инкубации вносили по 100 мкл реакционной смеси (содержит люциферин и люциферазу CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay, “Promega”, США). Измеряли интенсивность люминесценции (люцинометр Microlumet LB 96P (“Berthold”, Германия)).

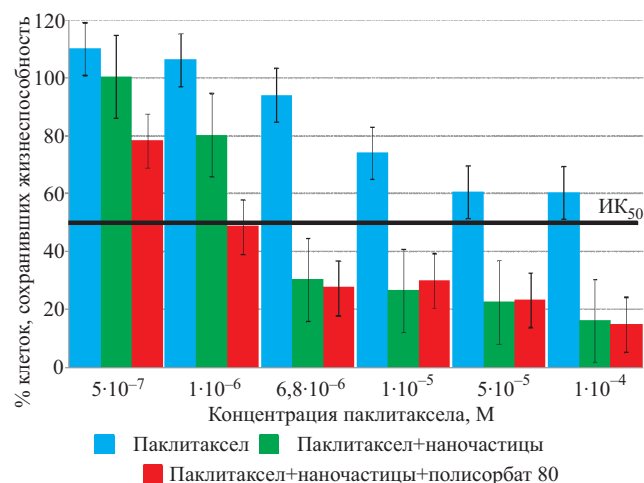
Статистическая обработка данных выполнялась с использованием программы Statistica 8.

Внутриклеточное накопление экспериментальных форм паклитаксела изучали методом флуоресцентной микроскопии.

В клеточные культуры добавляли 1 мл суспензии наночастиц с кумарином-6, спустя 2 ч инкубации клетки фиксировали 70 % раствором этанола и выдерживали при температуре 37 °С 20 мин. Затем клетки трижды промывали фосфатным буфером и добавляли пропидиум йодид в концентрации 1 мкг/мл (PI, “Sigma”, США) для окрашивания клеточных ядер. По окончании окрашивания клетки трижды промывали фосфатным буфером и рассматривали методом флуоресцентной микроскопии (Olympus BX51). При микроскопическом изучении НЧ с кумарином-6 флуоресцировали зеленым светом, а ядра клеток окрашивались в красный цвет.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

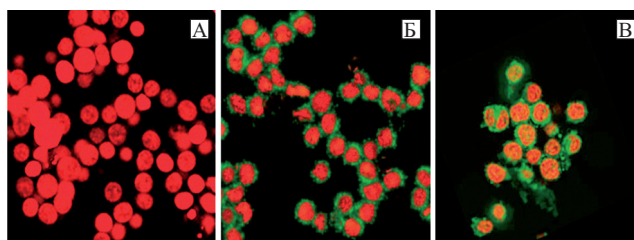
В настоящем исследовании были изучены противоопухолевая активность и внутриклеточное накопление НЧ с паклитакселом на мультирезистентной клеточной линии Jurkat WT. Для оценки цитотоксической активности различных наночастиц паклитаксела были вы-



**Рис. 3.** Цитотоксичность различных форм паклитаксела в АТФ тесте.

браны три биохимических теста: МТТ, ЛДГ и АТФ. Указанные тесты обладают разной чувствительностью и основаны на различных механизмах детекции повреждающего действия цитостатиков [7]. Согласно литературным данным цитотоксическая активность препарата считается высокой, если подавляется не менее 50 % (ИК<sub>50</sub>) клеточной биомассы. При этом цитотоксичность препарата должна проявляться в диапазоне низких концентраций ( $10^{-5}$  –  $10^{-6}$ ). Повышение ИК<sub>50</sub> до  $10^{-4}$  приводит к увеличению токсического воздействия на здоровые органы и ткани [2]. Экспериментальные формы паклитаксела тестировали в диапазоне концентраций от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$ . ИК<sub>50</sub> определяли графически (рис. 1 – 3). МТТ-тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)2,5-дифенил-2-Н-тетразолия бромид (МТТ) в нерастворимые в воде голубые кристаллы формаза. При этом количество образовавшегося формаза прямо пропорционально числу выживших клеток. В МТТ-тесте раствор паклитаксела в диапазоне тестируемых концентраций не достигал ИК<sub>50</sub>, в то время как его наносомальные формы достигали ИК<sub>50</sub> при низких концентрациях ( $6,8 \cdot 10^{-6}$  М), рис. 1.

ЛДГ-тест основан на измерении активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), выделившейся из цитоплазмы поврежденных клеток. Выделившаяся ЛДГ восстанавливает  $NAD^+$  до  $NADH^+$  путем окисления лактата в пируват. Во второй ферментативной реакции  $2H^+$  переносятся с  $NADH^+$  на желтую соль тетразолия [2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5фенил-2Н-тетразолия хлорид]; в ходе реакции получается водорастворимый красный формаза. Результаты оценки цитотоксичности, полученные нами в ЛДГ-тесте, коррелируют с данными МТТ-теста (рис. 2). При этом между раствором паклитаксела и его наносомальными формами наблюдаются статистически достоверные различия ( $p \leq 0,01$ ).



**Рис. 4.** Внутриклеточное распределение наночастиц в клетках Jurkat WT. Клетки были инкубированы в течение 2 ч с PLGA наночастицами, мечеными флуоресцентным кумарином-6. Клеточные ядра окрашивались пропидии йодидом (А), на фото они красного цвета. НЧ с кумарином-6 зеленого цвета (Б), НЧ, покрытые PS-80 с кумарином-6 (В).

АТФ-тест основан на измерении АТФ в метаболически активных клетках с использованием фермента люциферазы. Люцифераза катализирует реакцию образования света из ее субстрата люциферина и АТФ. Свет, выделившийся в ходе реакции, измеряется на люцинометре в относительных световых единицах (RLU). В АТФ-тесте наносомальная форма паклитаксела с суперпокрытием PS-80 достигала ИК<sub>50</sub> в минимальной концентрации ( $1 \cdot 10^{-6}$  М), рис. 3. При этом раствор паклитаксела в диапазоне тестируемых концентраций не достигал ИК<sub>50</sub>, а наночастицы паклитаксела без PS-80 достигали ИК<sub>50</sub> в более высоких концентрациях ( $6,8 \cdot 10^{-6}$  М).

Во всех трех тестах снижение концентрации раствора паклитаксела с  $1 \cdot 10^{-4}$  М до  $6,8 \cdot 10^{-6}$  М приводило к постепенному снижению его цитотоксичности, а в концентрации  $6,8 \cdot 10^{-6}$  М количество жизнеспособных клеток составляло 95 % по отношению к контролю. Очевидно, что в больших разведениях активность паклитаксела снижается. В концентрации  $6,8 \cdot 10^{-6}$  М наносомальные формы паклитаксела проявили выраженный цитотоксический эффект в сравнении с обычным паклитакселом — в МТТ- и ЛДГ-тестах жизнеспособность сохранили около 30 – 40 % клеток, а в АТФ-тесте — 27 % клеток. Кроме того, в АТФ-тесте наносомальная форма паклитаксела с PS-80 достигла ИК<sub>50</sub> в концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$ , при этом количество выживших клеток составило 48 %.

Наличие выраженной цитотоксической активности наносомальных форм паклитаксела в отличие от обычного паклитаксела свидетельствует о его проникновении в Jurkat клетки, экспрессирующие Р-гликопротеин. Предположительно входящие в состав экспериментальных форм паклитаксела PS-80 и полксамер 188 способны подавлять функцию Р-гликопротеина [9].

В ходе проведенных исследований выявлено, что НЧ на основе PLGA способны повышать цитотоксичность паклитаксела в отношении мультирезистентных клеток Jurkat. Наши результаты согласуются с данными, полученными в работах [7, 12]. Для подтверждения проникновения наночастиц в клетки нами было

проведено микроскопическое исследование. Флуоресцентная микроскопия показала, что PLGA НЧ с флуоресцентным кумарином-6 захватываются клетками Jurkat WT. После инкубации клеток с НЧ, мечеными кумарином-6, наблюдается интенсивная флуоресценция обычных НЧ и НЧ, покрытых ПС-80. Флуоресценция кумарина-6 наблюдается вокруг ядер: красные ядра окрашены пропидии йодидом, (рис. 4, Б), а также в самих ядрах (рис. 4, В), что указывает на захват клетками Jurkat WT меченых наночастиц. Наибольшая флуоресценция наблюдалась вокруг ядер и в ядрах клеток, инкубированных с НЧ, покрытыми ПС-80, в сравнении с НЧ без ПАВ.

## ВЫВОДЫ

1. Наночастицы с паклитакселом накапливаются в клетках Jurkat WT, экспрессирующих Р-гликопротеин.

2. Цитотоксическая активность наносомальных форм паклитаксела проявляется в низких концентрациях ( $10^{-6}$  М); жизнеспособность сохраняли около 30 % опухолевых клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Боят, Я. М. Хамди, Е. А. Оганесян и др., *Фармация*, **4**, 32 – 33 (2010).
2. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005).
3. A. Ambrosi, A. S. Khalansky, H. Yamamoto, et al., *J. Drug Target*, **14**(2), 97 – 105 (2006).
4. P. Anand, H. B. Nair, B. Sung, et al., *Biochem Pharmacol*, **79**(3), 330 – 338 (2010).
5. M. D. Chavanpatil, Y. Patil, J. Panyam, *Int. J. Pharm.*, **320**(1 – 2), 150 – 156 (2006).
6. C. Fonseca, S. Simoes, R. Gaspar, *J. Control. Release*, **83**(2), 273 – 286 (2002).
7. G. Fotakis and J. A. Timbrell, *Tox Letters*, **160**(2), 171 – 177 (2006).
8. J. M. Gallo, S. Li, P. Guo, et al., *Cancer Res.*, **63**(16), 5114 – 5117 (2003).
9. J. Huang, L. Si., L. Jiang, et al., *Int. J. Pharm.*, **356**(1 – 2), 351 – 353 (2008).
10. J. M. Kozlarski, P. R. Lockman, D. D. Allen, R. J. Mumper, *J. Control. Release*, **99**(2), 259 – 269 (2004).
11. R. T. Liggins, H. M. Burt, *Int. J. Pharm.*, **281**(1 – 2), 103 – 106 (2004).
12. A. Musyanovych, J. Schmitz-Wienke, V. Mailander, et al., *Macromol. Biosci.*, **8**(2), 127 – 139 (2008).
13. W. Sun, C. Xie, H. Wang, Y. Hu, *Biomaterials*, **25**(15), 3065 – 3071 (2004).
14. B. Wilson, M. K. Samanta, K. Santhi, et al., *Brain Res*, **1200**, 159 – 168 (2008).
15. B. Wilson, M. K. Samanta, K. Santhi, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **70**(1), 75 – 84 (2008).

Поступила 14.01.11

## INTRACELLULAR ACCUMULATION AND ANTITUMOR ACTIVITY OF VARIOUS NANOSOMAL FORMULATIONS OF PACLITAXEL

V. Boyat, V. Yu. Balabanyan, and R. N. Alyautdin

Sechenov Moscow State Medical Academy, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119992, Russia

Paclitaxel-loaded poly(lactic-glycolic) copolymer nanoparticles have been prepared using a precipitation technique. The cytotoxic activity of nanosomal paclitaxel was studied on the model of highly resistant cell line Jurkat WT (human T-cell leukemia) using various biochemical assays. It is found that the inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) for the experimental formulation of paclitaxel falls within  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$  M. Accumulation of nanoparticles in the highly resistant Jurkat/WT cells was revealed by fluorescence microscopy.

**Key words:** Paclitaxel, nanoparticles, Jurkat cells, *in vitro*