

Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СКОРОХІД НАДІЯ РОМАНІВНА

УДК 576+616-006+615.014.23+577.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОЛОГІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ БАГАТОФУНКЦІОНАЛЬНИХ
НАНОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ АДРЕСНОЇ ДОСТАВКИ ТРАДИЦІЙНИХ ТА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ**

091 – Біологія

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

Скорохід Н.Р.

Науковий керівник: Стойка Ростислав Стефанович, член-кореспондент НАН
України, доктор біологічних наук, професор

Львів – 2025

АНОТАЦІЯ

Скорохід Н.Р. Біологічна ефективність багатофункціональних наноматеріалів для адресної доставки традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2025.

Робота виконана на базі Інституту біології клітини НАН України, Львів, протягом 2022-2024 років.

Метою даної роботи було: 1) дослідження молекулярних механізмів дії *in vitro* новітніх систем доставки лікарських засобів з іммобілізованими на них традиційними та експериментальними протипухлинними препаратами та вивчення їх терапевтичної ефективності *in vivo* на експериментальних моделях пухлин у піддослідних тварин; 2) вивчення біосумісності досліджуваних наноматеріалів різної природи як потенційних носіїв для адресної доставки лікарських засобів.

Особливу увагу у роботі приділено новим хіміотерапевтичним підходам для пригнічення росту пухлин із використанням традиційних та експериментальних протипухлинних засобів. Продемонстровано модулювання активності цих препаратів у складі нанорозмірних комплексів, що дозволяє долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії та зменшувати їхній токсичний вплив на клітини нормальних тканин. Проведена оцінка біосумісності досліджуваних наноматеріалів різної природи підтверджує їхній потенціал як ефективних носіїв для адресної доставки медикаментозних засобів.

Пошук нових фармацевтичних препаратів і протоколів лікування раку є пріоритетним завданням сучасної медицини. Ефективна хіміотерапія повинна відповідати певним критеріям, зокрема мати високу специфічність та ефективність щодо ракових клітин, відзначатися високою біодоступністю, мінімізованими побічними ефектами, зручністю застосування та невисокою вартістю. Використання природних сполук і їхніх хімічно модифікованих похідних є

перспективною стратегією лікування раку та джерелом створення нових фармацевтичних препаратів. Поєднання таких сполук із сучасними технологіями доставки лікарських засобів, зокрема наноматеріалами, сприяє підвищенню їхньої специфічності, біодоступності та стійкості в організмі. Це відкриває нові можливості для розробки ефективних і безпечних терапевтичних стратегій, здатних подолати медикаментозну резистентність пухлин і покращити якість життя пацієнтів.

Розробка нових форм уже відомих лікарських засобів є важливим напрямом сучасної фармакології, оскільки дозволяє підвищити їхню ефективність і зменшити токсичний вплив на нормальні тканини організму. Проведені дослідження показали, що поєднання доксорубіцину (Dx) і ліпофільного цитопротекторного N-стеароїлетаноламіну (NSE) на одній нанорозмірній платформі (PC) дозволило в чотири рази зменшити негативні побічні ефекти протипухлинного препарату та підвищити його терапевтичну ефективність *in vivo*, сприяючи пригніченню росту лімфоми та лейкозу у мишей при зменшеній вдвічі терапевтичній дозі. Функціоналізація нанополімерного комплексу доксорубіцину NSE спричинила синергічний ефект, зумовлений ліпофільною природою NSE. Це забезпечує швидке проникнення препарату в клітини-мішені, ефективніше подолання набутої медикаментозної резистентності пухлин та прискорене ініціювання апоптозу.

Дослідження механізмів апоптозу показало суттєві відмінності у запуску сигнальних шляхів за використання доксорубіцин-NSE-вмісних наноконструкцій. Вільний Dx чинить проапоптичний вплив на клітини, але його дія залежить від концентрації та тривалості експозиції. В концентрації 2 мкМ Dx ініціює слабе розщеплення ініціаторних каспаз-8, -9, -10, що свідчить про незначну роль мітохондріального шляху у загибелі клітин. Це підтверджено за допомогою методу з використанням JC-1, який вказує на мінімальне залучення мітохондрій у процес апоптозу. Ймовірно, Dx тут ініціює загибель клітин через альтернативні механізми, зокрема прямий вплив на ДНК або позамітохондріальні сигнальні шляхи, однак, це

потребує подальших досліджень для точного визначення молекулярних мішеней доксорубіцину та особливостей його апоптотичного потенціалу.

Застосування комплексу Dх-PC-NSE продемонструвало іншу динаміку активації апоптотичних шляхів. Активація ініціаторної каспази-9 відбувалася із затримкою до 9 год, що може вказувати на модифікацію мітохондріального шляху. Водночас ефекторна каспаза-3 виявила значно вищу активність, що свідчить про залучення альтернативних сигнальних шляхів, зокрема рецептор-залежного каскаду. Через 12 год комплекс Dх-PC-NSE забезпечував повну активацію апоптозу, тоді як Dх і Dх-PC діяли менш ефективно.

Часткове пригнічення мітохондріальної продукції активних форм оксигену (АФО) під дією комплексу Dх-PC-NSE, ймовірно, пояснює затримку активації каспази-9. Водночас підвищена активність каспази-3 може бути пов'язана із залученням альтернативних шляхів апоптозу, таких як рецептор-залежний апоптоз, опосередкований активацією каспази-8. Синергічна дія між цими шляхами, зумовлена комплексом Dх-PC-NSE, вказує на його багатовекторну дію на клітини лінії Jurkat. Отримані результати підтверджують вищий проапоптичний потенціал Dх-PC-NSE, порівняно з дією інших форм доксорубіцину, зокрема через його здатність ініціювати швидке розщеплення субстратів каспаз-3, -8, -9 й активувати каспазу-2. Особливо важливо, що комплекс Dх-PC-NSE забезпечує стабільну активацію апоптозу навіть за пригнічення мітохондріальних механізмів, що робить цей наноконкомпозит перспективним для терапії пухлин із резистентністю до стандартних хіміопрепаратів.

Антиоксидантна активність NSE не проявляється за його комбінованої дії з Dх, що може пояснюватися слабкою водорозчинністю цього біоактивного ліпиду. Це обмежує його проникнення в цитозоль пухлинних клітин, і відповідно, унеможливорює реалізацію цитопротекторного ефекту. Імобілізація NSE та Dх на нанорозмірному полімерному носії (PC) забезпечує спрямовану доставку цієї ліпідної субстанції до мітохондрій клітин-мішеней, сприяючи стабілізації їхніх мембран.

Дослідження активності нанокомпозитів з іммобілізованими Dx та NSE на експериментальній моделі у миші показало виражене дозозалежне підвищення терапевтичної активності Dx щодо лімфоми NK/Ly та лейкозу L1210 при використанні ко-іммобілізованого NSE. Отримані результати також вказують на важливу роль NSE у модуляції негативних побічних ефектів доксорубіцину *in vivo*.

Таким чином, створене в роботі унікальне поєднання цитопротектора N-стеароїлетаноламіну та протипухлинного препарату Dx на одній платформі доставки медикаментозного препарату дає змогу вирішити дві принципові проблеми хіміотерапії раку, а саме: 1) зниження ефективної дози хіміотерапевтичного агенту без втрати його терапевтичної дії; 2) захист нормальних клітин організму від токсичного впливу Dx завдяки цитопротекторним властивостям NSE. Отримані результати свідчать про значний потенціал застосування Dx-NSE-нанокомпозитних комплексів у клінічній практиці як перспективного напрямку для покращення ефективності та безпечності хіміотерапії раку.

Останніми роками зріс інтерес до вивчення природних низькомолекулярних біоактивних сполук, які використовують у медицині, зокрема у хіміотерапії раку. Наше дослідження було зфокусоване на берберині та його напівсинтетичних 9-О-модифікованих похідних як потенційних протипухлинних агентів. Їх застосування обмежене через низьку розчинність, що призводить до поганої біодоступності, швидкий метаболізм в організмі та недостатню селективність. Для покращення дії берберину та його структурно модифікованих похідних було здійснено їхню іммобілізацію на трьох різних гребенеподібних полімерних носіях.

Створені нами нанокомпозити берберину та 9-О-октил-берберину на полімерних наноносіях характеризуються високою розчинністю і стабільністю у водному середовищі, рівномірним проникненням в пухлинні клітини та низькою токсичністю щодо здорових тканин та органів піддослідних мишей, при цьому зберігаючи ефективну терапевтичну активність щодо мишачої меланоми B16F10 дикого типу.

Запропоновану стратегію можна використати також для покращення водорозчинності інших напівсинтетичних природних сполук, розчинних лише в органічних розчинниках і тому незручних для доклінічних досліджень, що сприятиме підвищенню їхнього терапевтичного потенціалу.

Показано, що нові синтетичні похідні берберинів є перспективними протипухлинними препаратами, а використання їхніх нанорозмірних комплексів на носіях різної природи покращує розчинність у водних розчинах, підвищує біодоступність і сприяє зменшенню негативних побічних ефектів на організм.

Проведено порівняльне дослідження трьох розгалужених полімерних носіїв: 1) полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ; 2) полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-рEtOx; 3) полі(ПЕГМА-ко-ДММ), що містять ланки полі(етиленгліколь)-метилетилметакрилату (ПЕГМА) та диметилмалеату (ДММ). Вони показали високу біосумісність як *in vitro*, так і *in vivo*, не спричиняючи значної цитотоксичної дії *in vitro* навіть у високих концентраціях (>50 мкМ). Отримана сумарна доза цих полімерів в організмі тварин становила 664 мг/кг, що відповідає кількості полімерного носія, який містить 20 мг/кг іммобілізованого протипухлинного препарату, який не проявляв токсичної дії на піддослідні тварини. Оцінку потенційних побічних ефектів від дії нових полімерних носіїв на основі VER-co-GMA та PEGMA-co-DMM *in vivo* проводили за допомогою аналізу морфологічних та біохімічних показників у мишей лінії C57/Bl6. Найвищий потенціал біобезпеки виявив полімерний наноносій полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-рEtOx, який використовували як платформу для доставки експериментальних протипухлинних препаратів.

Вивчено протипухлинну активність мінеральних наночастинок на основі оксиду феруму (III), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном). Ймовірний механізм цитотоксичності, спричиненої магнітними наночастинами mag.SLPs, зумовлений генерацією АФО, зокрема H_2O_2 та $\text{O}_2^{\cdot-}$, які індукують клітинну загибель. Встановлено, що механізми клітинної загибелі включають як апоптоз, що супроводжується порушенням

клітинного циклу та фрагментацією ДНК, так і некроз, підтверджений порушенням цілісності мембрани (забарвлення клітин пропідію йодидом, PI).

Ключові слова: нанорозмірні носії, протипухлинні препарати, пухлини клітини, апоптоз, множинна медикаментозна резистентність, активні форми кисню.

SUMMARY

Skorokhyd N. **Biological efficiency of multifunctional nanomaterials for a targeted delivery of traditional and experimental antitumor drugs.** On the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 Biology. - Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2025.

The work was carried out during 2022-2024 at the Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine in Lviv.

The aim of this research is to investigate the molecular mechanisms of the *in vitro* action of the latest drug delivery systems with immobilized traditional and experimental antitumor drugs, and to study their therapeutic efficacy *in vivo* in tumor models in laboratory mice. The study also explores the biocompatibility of the investigated nanomaterials of different nature as potential carriers for targeted drug delivery.

Particular attention is paid to new chemotherapeutic approaches used to inhibit tumor growth through applying both traditional and experimental anticancer agents. The modulation of the activity of these drugs in the nanoscale complexes has been demonstrated, that allows overcoming the acquired resistance of malignant cells to chemotherapy and reducing their toxic effects towards cells of normal tissues. The biocompatibility assessment of the studied nanomaterials confirms their potential as effective carriers for targeted drug delivery.

The search for new pharmaceuticals and cancer treatment protocols is a priority for modern medicine. Effective chemotherapy must meet certain criteria, including high specificity and efficacy against cancer cells, high bioavailability, minimized side effects,

and ease of use. The application of natural compounds and their chemically modified derivatives is a promising strategy in cancer treatment and might be a source of new pharmaceuticals. Combining such compounds with modern drug delivery technologies, particular nanomaterials, helps to increase their specificity, bioavailability and stability in the body. This opens up new opportunities for the development of effective and safe therapeutic strategies that can overcome drug resistance in tumors and improve the quality of life of patients.

The development of new formulations of already known drugs is an important area of modern pharmacology, as it allows to increase their efficacy and reduce the toxic effects on normal body tissues. Our studies have shown that the combination of doxorubicin (Dx) and the lipophilic cytoprotective agent N-stearoyl ethanolamine (NSE) on a single nanoscale delivery platform reduced the negative side effects of the antitumor drug by four times and doubled its therapeutic efficacy *in vivo*, contributing to the inhibition of lymphoma and leukemia growth in mice.

Functionalization of the Dx–nanopolymer complex with NSE resulted in a synergistic effect due to the lipophilic nature of the NSE. This modification facilitates rapid drug penetration into target cells, enhances the ability to overcome acquired tumor drug resistance, and accelerates the initiation of apoptosis.

The study of apoptosis mechanisms revealed significant differences in the activation of signaling pathways when using Dx–NSE-containing nanocomposites. Free Dx exhibits a proapoptotic effect on cells and this effect is concentration- and time-dependent. At 2 μ M concentration, Dx induces only weak cleavage of initiator caspases-8, -9, and -10, suggesting a limited involvement of the mitochondrial pathway in cell death. This is confirmed by the JC-1 assay, which indicates minimal involvement of mitochondria in the apoptosis process. It is likely that Dx initiates cell death via alternative mechanisms, such as direct DNA damage or extra-mitochondrial signaling pathways. However, additional studies are required to precisely identify the molecular targets of Dx and to clarify the specifics of its apoptotic potential.

The use of Dx-PC-NSE demonstrated distinct dynamics in the activation of apoptotic pathways. The activation of caspase-9 was delayed by up to 9 hours, suggesting

a possible modulation of the mitochondrial pathway. At the same time, the effector caspase-3 showed significantly higher activity indicating the involvement of alternative signaling pathways, particularly the receptor-dependent cascade. After 12 hours, Dx-PC-NSE complex provided complete activation of apoptosis, whereas Dx and Dx-PC acted less effectively.

The partial inhibition of mitochondrial production of the reactive oxygen species (ROS) by Dx-PC-NSE probably explains the delay in caspase-9 activation. At the same time, an increased caspase-3 activity may be associated with the involvement of alternative apoptotic pathways, such as receptor-dependent apoptosis mediated by caspase-8 activation. The synergy between these pathways caused by Dx-PC-NSE indicates a multidirectional effect of this composite on Jurkat T-cells. The obtained results confirm the higher proapoptotic potential of Dx-PC-NSE complex compared to other forms of Dx, particularly due to its ability to initiate rapid cleavage of caspase-3, -8, -9 substrates and fully activate caspase-2. Importantly, Dx-PC-NSE complex provides a stable activation of apoptosis even under conditions of mitochondrial pathway inhibition, making this nanocomposite a promising candidate for treating tumors resistance to standard chemotherapy.

The antioxidant activity of the NSE is not evident when combined with Dx, likely due to poor water solubility of this bioactive lipid. This limitation hinders its penetration into the cytosol of tumor cells, thereby preventing the manifestation of its cytoprotective effects. However, immobilization of the NSE and doxorubicin on a nanoscale polymeric carrier enables targeted delivery of the NSE to the mitochondria of tumor cells, contributing to stabilization of the mitochondrial membranes.

The study of the activity of nanocomposites with immobilized Dx and NSE in mouse models showed a pronounced dose-dependent increase in the therapeutic activity of Dx against NK/Ly lymphoma and L1210 leukemia when co-immobilized with NSE. The results also indicate a significant role of the NSE in modulating side effects of Dx *in vivo*.

Thus, a unique combination of a cytoprotective agent and antitumor drug on a drug delivery platform addresses two fundamental problems of cancer chemotherapy, namely:

1) reducing the effective dose of a chemotherapeutic agent without losing its therapeutic effect; 2) protecting normal cells from the toxic effects of doxorubicin due to the cytoprotective properties of the NSE. The obtained results indicate a significant potential of using Dx-NSE nanocomposite complex in clinical practice as a promising strategy for improving the efficacy and safety in cancer chemotherapy.

In recent years, the growing interest has appeared to studying of natural low molecular weight bioactive compounds in medicine, particularly for cancer chemotherapy. Our research focuses on berberine and its semi-synthetic 9-O-modified derivatives as potential antitumor agents. Their application is limited due to their low solubility, which leads to poor bioavailability, rapid metabolism in the body, and insufficient selectivity. To improve the action of berberine and its structurally modified derivatives, their immobilization on three different comb-like polymeric carriers was applied.

It has been shown that the developed nanocomposites of berberine and 9-O-octyl-berberine on the polymeric nanocarriers demonstrated their high solubility and stability in aqueous medium, uniform penetration into tumor cells and low toxicity to healthy tissues and organs of experimental mice, while maintaining effective therapeutic activity against wild-type mouse melanoma B16F10.

The proposed strategy can also be used to improve the water solubility of other semi-synthetic natural compounds that are only soluble in the organic solvents and therefore, inconvenient for preclinical studies, which will increase their therapeutic potential.

Thus, new synthetic berberine derivatives are promising anticancer drugs, and using their nanoscale complexes on carriers of different natures improves solubility in aqueous solutions, increases bioavailability, and helps reduce negative side effects on the body.

A comparative study of branched polymeric scaffolds was carried out using: 1) poly(VEP-co-GMA)-graft-mPEG; 2) poly(VEP-co-GMA)-graft-pOX; 3) poly(PEGMA-co-DMM) containing poly(ethylene glycol)-methyl methacrylate (PEGMA) and dimethylmaleate (DMM) chains. They demonstrated high biocompatibility both *in vitro*

and *in vivo* without causing significant cytotoxic effects *in vitro* even at high doses ($>50\ \mu\text{M}$). The total dose of these polymers in animals was 664 mg/kg, that corresponds to a polymer carrier containing 20 mg/kg of immobilized anticancer drug, which did not show toxicity to experimental animals. The potential side effects of the new polymeric carriers based on VEP-co-GMA and PEGMA-co-DMM *in vivo* were evaluated by analyzing the morphophysiological and biochemical parameters in C57/Bl6 mice. The highest biosafety potential was demonstrated by the polymeric nanocarrier poly(VEP-co-GMA)-graft-pEtOX, which was used as a platform for delivering experimental anticancer drugs.

The antitumor activity of mineral nanoparticles based on iron(III) oxide functionalized with oleic acid and poly(ethylene oxide)-block-poly(ϵ -caprolactone), was studied, and molecular mechanisms of its action were proposed. The probable mechanism of cytotoxicity induced by magnetic nanoparticles (mag. SLPs) involves the generation of ROS, particularly H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$, which contribute to cell death. The observed cell death mechanisms include both apoptosis characterized by cell cycle disruption and DNA fragmentation and necrosis, confirmed by the loss of membrane integrity as revealed by PI staining.

Keywords: nanoscale carriers, antitumor drugs, cancer cells, apoptosis, multidrug resistance, reactive oxygen species.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних

Web of Science Core Collection та/або Scopus:

(* - рівноцінний вклад у роботу)

1. Panchuk* R.; **Skorokhyd*** N.; Chumak V.; Lehka L.; Kosiakova H.; Horid'ko T.; Hudz I.; Hula N.; Riabtseva A.; Mitina N.; et al. Cannabimimetic N-Stearoylethanolamine as “Double-Edged Sword” in Anticancer Chemotherapy: Proapoptotic Effect on Tumor Cells and Suppression of Tumor Growth versus Its Bio-Protective Actions in Complex with Polymeric Carrier on General Toxicity of Doxorubicin *In Vivo*. *Pharmaceutics* 2023, 15, 835 (IF- 4,9, Q1, Pharmacology & Pharmacy). <https://doi:10.3390/pharmaceutics15030835>. *– Equal contribution

(Дисертантка виконала основні дослідження протипухлинної активності in vitro нанорозмірних комплексів, спільно із науковим керівником та співавторами сформулювала ідею цієї роботи, узагальнила результати біологічної частини та підготувала їх до публікації).

2. Świątek M., Panchuk R., **Skorokhyd** N., Černoch P., Finiuk N., Klyuchivska O., Hrubý M., Molčan M., Berger W., Trousil J., Stoika R., Horák D. Magnetic Temperature-Sensitive Solid-Lipid Particles for Targeting and Killing Tumor Cells *Frontiers in Chemistry*. 2020. Vol. 8, No. 205. P.1–18 (IF – 3,8, Q1). <https://doi:10.3389/fchem.2020.00205>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7161697/>

(Скорохід Н.Р. виконала дослідження протипухлинної активності in vitro досліджуваних наночастинок та спільно із співавторами брала участь у аналізі та описі отриманих даних).

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. **Skorokhyd** N., Panchuk R., Zaichenko O., Mitina N., Lizhen Wang, Kechun Liu, Meng Jin, Klishch M., Stoika R. Modulating the Biological Effect of Berberine via Its Immobilization on Different Polymer Nanocarriers. *Cytology and Genetics*, 2025, Vol. 59, No. 3, pp. 270-280. (IF – 0,5, Q4)

2. Paryzhak S., Dumych T., Zasońska B., Svoboda J., Klyuchivska O., **Skorokhyd N.**, Kozak Y., Horák D., Stoika R. Improvement of hemocompatibility of γ -Fe₂O₃ nanoparticles via their covering with complex poly(N,N-dimethylacrylamide) and SiO₂ shell. *Applied Nanoscience* 13, 7399–7412 (2023). (IF – 3.869, Q2), <https://doi:10.1007/s13204-023-02905-3>.
3. Klishch M., **Skorokhyd N.**, Panchuk R., Stoika R. Biochemical and cellular mechanisms of immunogenic cell death. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2024, 96(6), pp. 5–16 (Q4) doi: <https://doi.org/10.15407/ubj96.06.005>
4. Manko N., Lootsik M., Antonyuk V., Ivasechko I., **Skorokhyd N.**, Kosiakova H., Mehed' O., Horid'ko T., Hula N., Klyuchivska O., Panchuk R., Pokhodylo N., Barabash O., Dumych T., Stoika R. Multifunctional chitosan-based hydrogels: characterization and evaluation of biocompatibility and biodegradability *in vitro*. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2024, 96(1), pp. 80–95 (Q4) doi: <https://doi.org/10.15407/ubj96.01.080>
5. Martínez R., Geronimo B.D., Pastor M., Zapico J.M., Coderch C., Panchuk R., **Skorokhyd N.**, Maslyk M., Ramos A., de Pascual-Teresa B. Multitarget Anticancer Agents Based on Histone Deacetylase and Protein Kinase CK2 inhibitors. *Molecules*. 2020. Vol. 25, No. 7. P. 1497. (IF – 4,2, Q1) DOI: [10.3390/molecules25071497](https://doi.org/10.3390/molecules25071497)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7180456/>
6. Kobylinska L., Ivasechko I., **Skorokhyd N.**, Panchuk R., Riabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari S.G. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019. Vol. 14, No. 1. P. 140. (IF – 4,703, Q1)
DOI: [10.1186/s11671-019-2945-7](https://doi.org/10.1186/s11671-019-2945-7)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31016407/>
7. Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Yu. S., Lehka L. V., Moiseenok A. G., Stoika R. S. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential. *Croatian Medical Journal*. 2017. Vol. 58, No 2. P. 171–184. (IF – 1,5, Q2)
DOI:10.3325/cmj.2017.58.171

<http://www.cmj.hr/2017/58/2/28409500.htm>

8. Prylutska S., Panchuk R., Gołuński G., Skivka L, Prylutsky Yu., Hurmach V., **Skorokhyd N.**, Borowik A., Woziwodzka A., Piosik J. , Kyzyma O., Garamus V., Bulavin L., Evstigneev M., Buchelnikov A., Stoika R. , Berger W., Ritter U., Scharff P. C₆₀ fullerene enhances anticancer activity of cisplatin *in vitro* and *in vivo* and facilitates circumvention of drug resistance in tumor cells. *Nano Research*. 2017. Vol. 10, No. 2. P. 652–671 (**IF – 9,6, Q1**) DOI 10.1007/s12274-016-1324-2

https://www.researchgate.net/publication/309813023_C60_fullerene_enhances_cisplatin_antitumor_activity_and_overcomes_tumor_cell_drug_resistance

9. Purwin M., Hernandez-Toribio J., Panchuk R., **Skorokhyd N.**, Filipiak K., de Pascual-Teresa B., Ramos A. Design and Synthesis of Novel Dual-Target Agents for HDAC1 and CK2 Inhibition. *RSC Advances*. 2016. Vol. 6. P. 66595–66608. (**IF – 3,9, Q2**)

DOI: [10.1039/C6RA09717K](https://doi.org/10.1039/C6RA09717K)

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/RA/C6RA09717K#!divAbstract>

10. Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Y. S, Lehka L. V., Chumak V. V., Omelyanchik S. N., Gurinovich V. A., Moiseenok A. G., Stoika R. S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine decrease the negative side effects of doxorubicin in NL/Ly lymphoma-bearing mice. *Croatian Medical Journal*. 2016. Vol. 57, No 2. P. 180–192. (**IF – 1,624, Q2**) DOI:10.3325/cmj.2016.57.180

<http://www.cmj.hr/2016/57/2/27106359.htm>

11. Kozak Yu. S., Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Lehka L. V., Stoika R. S. Impact of N-acetylcysteine on antitumor activity of doxorubicin and landomycin A in NK/Ly lymphoma-bearing mice. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, No 2. P. 46–54. (**Q4**)_DOI:10.15407/ubj90.02.046

<http://ukrbiochemjournal.org/2018/03/impact-of-n-acetylcysteine-on-antitumor-activity-of-doxorubicin-and-landomycin-a-in-nkly-lymphoma-bearing-mice.html>

12. Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Yu. S., Lehka L. V., Moiseenok A. G., Stoika R. S. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS

scavenging potential. *Croatian Medical Journal*. 2017. Vol. 58, No 2. P. 171–184. (IF – 1,5, Q2) DOI:10.3325/cmj.2017.58.171

<http://www.cmj.hr/2017/58/2/28409500.htm>

13. Antonyuk V. O., **Skorohyd N. R.**, Lozynskyi A. V., Antonyuk R. V., Lesyk R. B., Stoika R. S. Use of lectins as vector molecules for delivery of drugs to cells and tissues . *Biopolymers and Cell*. 2019. Vol.35, No. 1. P. 54-63. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000994>

14. Lehka L. V., Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Y.S., Rohr J., Stoika R. R. Study of inhibition of B16F10 melanoma growth in mice by landomycin A in comparison to doxorubicin. *Studia Biologica*. 2016. Vol. 10, No 1. P. 5–16.

DOI:10.30970/sbi.1001.467

<http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology/article/view/62>

15. Kozak Yu. S., Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Semenovich D. S., Moiseenok A. G, Stoika R. S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine differentially affect doxorubicin's action on glutathione system in human leukemia cells varying in their resistance to chemotherapy *in vitro*. *Studia Biologica*. 2018. Vol. 12, No 2. P. 13–24

DOI:10.30970/sbi.1202.569

<http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology/article/view/817>

Розділ у монографії

Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носії, біофункціоналізованому N-стеаройлоетаноламіном / **Панчук Р.Р.**, Чумак В.В., Скорохід Н.Р., Гула Н.М., Гудзь Є.А., Мітіна Н.Є., Заіченко О.С., Стойка Р.С. // Розділ монографії «Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування» / Редкол.: Р.С. Стойка (гол. ред.); НАН України. – К. : Наукова Думка, 2017. – 368 с., 24 с. іл. – С. 97-108.

Основні тези доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких були апробовані результати дисертації (всього тез – 5)

1. **Skorokhyd N.R.**, Panchuk R.R., Kh. Harhay, Mitina N.E., Zaichenko O.S., Stoika R.S. Novel branched polymer drug carriers containing grafted side polyethylene glycol

(mPEG) or polyoxazoline (pOX) chains: biocompatibility *in vivo*. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 30.

2. Mykola Klishch, **Nadiya Skorokhyd**, Rostyslav Panchuk, Rostyslav Stoika. Induction of immunogenic cell death in murine melanoma by a novel thiosemicarbazone derivative. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 84.

3. Думич Т.І., Парижак С.Я., **Скорохід Н.Р.**, Горак Д., Стойка Р.С. Зміна показників крові дослідних тварин за дії NaYF₄:Yb,Er,Pr-вмісних наночастинок. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення та перспективи лектиноморфології» до 70-річного ювілею професора кафедри гістології, цитології та ембріології, Лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Олександра Дмитровича Луцика: тези доповідей. (Львів, 10.05.2024). 2024: 52

4. Paryzhak S.Ya., Dumych T.I., **Skorokhyd N.R.**, Horák D., Stoika R.S. Changes in the biochemical and hematological indicators of experimental animals under the influence of NaYF₄:Yb,Er,Pr upconverting nanoparticles. The International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2024). Abstract Book of participants of the International research and practice conference, Uzhhorod National University. (Uzhhorod, Ukraine, 21.08–24.08, 2024) 2024: 286.

5. Paryzhak S., Dumych T., **Skorokhyd N.**, Klyuchivska O., Horák D., Stoika R.S. Biosafety assessment of biosphosphonate-modified polymer-coated NaYF₄:Yb,Er,Pr upconverting nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* studies. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 86.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
SUMMARY	7
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	12
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	21
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1	30
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	30
1.1. Сучасні підходи хіміотерапії раку	30
1.1.1. Таргетна хіміотерапія	31
1.1.2. Комбінована хіміотерапія	33
1.2. Механізми виникнення множинної медикаментозної резистентності пухлин та шляхи її подолання	34
1.3. Використання наноматеріалів у протипухлинній терапії.....	36
1.3.1. Адресна доставка протипухлинних препаратів за допомогою наноматеріалів.....	36
1.3.2. Пасивне таргетування.....	37
1.3.3. Активне таргетування	38
1.3.4. Подолання медикаментозної резистентності ракових клітин за допомогою наноносіїв	38
1.4. Основні види наноматеріалів, які використовують для доставки ліків	40
1.4.1. Ліпосоми	40
1.4.2. Дендримери.....	41
1.4.3. Полімерні наноматеріали	42
1.5. Багатофункціональні наноматеріали для доставки ліків в організмі:структура і переваги перед традиційними наноматеріалами	45
1.5.1. Застосування поліетиленгліколю у багатофункціональних наноматеріалах.....	47
1.6. Використання полімерних наноматеріалів у хіміотерапії раку.....	49
1.7. Цільова доставка лікарських засобів за допомогою наночастинок	51
1.8. Проблеми біобезпеки у застосуванні наноматеріалів	53
РОЗДІЛ 2	57

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	57
2.1. Наноматеріали, використані в роботі.....	57
2.1.1. Полімерний носій на основі N-вінілпіролідон-5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-гліцидилметакрилату та його нанорозмірні комплекси з доксорубіцином.....	57
2.1.2. Структура гребенеподібних амфіфільних полімерних носіїв із різними модифікаціями будови.	60
2.1.3. Будова та отримання нанокомпозитів на основі гребенеподібних полімерних носіїв та алкалоїдів.....	61
2.1.4. Будова та синтез мінеральних наночастинок на основі оксиду заліза (III), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном)	63
2.2. Біологічна частина	64
2.2.1. Матеріали	64
2.2.2 Культивування клітин <i>in vitro</i>	65
2.2.3. Методи оцінки цитотоксичної дії досліджуваних сполук	66
2.2.4. Визначення апоптозу	67
2.2.5. Аналіз клітинного циклу.....	67
2.2.6. Дослідження проникнення досліджуваних сполук у клітини-мішені	68
2.2.7. Оцінка продукції активних форм кисню (АФО) під впливом різних факторів	69
2.2.8. Визначення вмісту тіолів в клітинах.	69
2.2.9. Оцінка функціонального статусу мітохондрій злоякісних клітин за дії різних чинників.....	70
2.2.10. Вестерн-блот-аналіз білків	70
2.2.11. Дослідження <i>in vivo</i>	74
2.2.12. Статистична обробка отриманих результатів дослідження	76
РОЗДІЛ 3	77
РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	77
3.1. Посилення селективності протипухлинної дії доксорубіцину шляхом його ко-імобілізації з NSE на полімерному носії	77

3.1.1. Цитотоксична та цитопротекторна дія NSE щодо злоякісних та псевдонормальних клітин людини <i>in vitro</i>	78
3.1.3. Модуляція цитотоксичної дії доксорубіцину на пухлинні клітини <i>in vitro</i> за допомогою іммобілізації протипухлинного антибіотику на полімерних носіях, функціоналізованих різними типами N-ацилетаноламінів	88
3.1.4. Вплив спільної іммобілізації Dx та NSE на PC на рівень АФО та індукцію загибелі пухлинних клітин <i>in vitro</i>	95
3.1.5. Дослідження активності нанокомпозитів з іммобілізованими Dx та NSE на моделях мишей.	104
3.1.6. Вивчення здатності NSE в складі нанорозмірного комплексу з доксорубіцином знижувати токсичну дію доксорубіцину в організмі експериментальних тварин.	108
3.2. Забезпечення водорозчинності та пролонгованої протипухлинної дії берберину та його похідної - 9-О-октил-берберину шляхом їх іммобілізації на носіях різної структури.	112
3.2.1. Оцінка цитотоксичної активності берберину та його нанорозмірних комплексів щодо нормальних та злоякісних клітин ссавців.	114
3.2.2. Дослідження антиоксидантної активності берберину та його нанорозмірних комплексів за показниками рівня АФО та відновленого глутатіону.	118
3.2.3. Підвищення розчинності та протипухлинного потенціалу 9-О-октил-берберину шляхом іммобілізації на гребенеподібних полімерних носіях.	122
3.2.4. Дослідження терапевтичного ефекту берберину та 9-О-октил-берберину та їхніх комплексів на полімерному носію з прищепленим фрагментом поліоксазоліну щодо організму мишей з експериментальними пухлинами (мишача меланома B16/F10 дикого типу).	127
3.3. Порівняльне дослідження токсичності нових полімерних носіїв на основі VEP-co-GMA та PEGMA-co-DMM <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	134
3.3.1. Дослідження цитотоксичної активності наноносіїв на основі VEP-co-GMA та PEGMA-co-DMM щодо різних типів пухлинних та псевдонормальних клітин <i>in vitro</i>	135

3.3.2. Оцінка потенційних побічних ефектів нових полімерних носіїв на основі VER-co-GMA та PEGMA-co-DMM <i>in vivo</i> шляхом аналізу морфофізіологічних та біохімічних показників у мишей лінії C57/Bl6 ...	137
3.4. Дослідження протипухлинної активності нових наночастинок на основі оксиду феруму (III), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном) як систем для доставки лікарських засобів.	141
3.4.1. Оцінка цитотоксичної дії <i>in vitro</i> мінеральних наночастинок оксиду заліза SLPs (mag.SLPs) щодо різних типів пухлинних клітин.....	142
3.4.2. Визначення антиоксидантних та проапоптичних властивостей магнітних наночастинок на основі оксиду феруму (III) mag.SLPs.....	148
РОЗДІЛ 4	154
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	154
ВИСНОВКИ.....	158
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	160
ДОДАТОК 1	184
ДОДАТОК 2	189
ДОДАТОК 3	191
ДОДАТОК 4	195
ДОДАТОК 5	197
ДОДАТОК 6	201
ДОДАТОК 7	204
ДОДАТОК 8	216
ДОДАТОК 9	224

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

alcVerb – алкіл-берберин

BCRP – білок резистентності раку молочної залози (breast cancer resistance protein)

Verb – берберин

Chl – хлороформ

DCFDA – дигідрохлорофлуоресцеїн діацетат

DHE – дигідроетидій

Dx – доксорубіцин

Dx-ПК/Dx-PC – нанокомпозит доксорубіцину

Dx-ПК-NSE/Dx-PC-NSE – нанокомпозит доксорубіцину, функціоналізований N-стеароїлетаноламіном

EGFR – рецептор епідермального фактора росту

EPR-ефект – ефект посиленого проникнення та утримання

FACS-аналіз – проточна цитофлуориметрія

FDA – управління з продовольства і медикаментів США

GSH – відновлений глутатіон

i.p – інтерперитонеальне (доочеревинне) введення лікарського засобу

IO/IONP – наночастинки оксиду феруму

IO-OA – оксид феруму, стабілізований олеїною кислотою

JC-1 – 5,5'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраетилбензimidазолікарбоціанін йодид

LC50 – концентрація сполуки, яка призводить до загибелі 50% клітин

mag.SLPs – магнітні тверді ліпідні частинки

mBCl – монохлоробіман

MRP-1 – білок, асоційований із множинною медикаментозною резистентністю (multidrug-resistance associated protein)

NAE - N-ацилетаноламіни

NPE – N-пальмітоїлетаноламін

NSE – N-стеароїлетаноламін

PBS/ЗФР – буферний фізіологічний розчин
PC-PEG - полімерний носій з фрагментом ПЕГ 5000
PC-PEGMA – полімерний носій з фрагментом гліцидилметакрилату
PC-pEtOX – полімерний носій з фрагментом полі-2-оксазоліну
P-gr – Р-глікопротеїн
PI – пропідію йодид
PLGA – поліетиленгліколь-полі(N-ізопропіл акриламід)
SLPs – тверді ліпідні частинки
VEGF – васкулярний ендотеліальний фактор росту
АлАТ – аланінамінотрансфераза
АсАТ – аспартатамінотрансфераза
АФО – активні форми кисню
ДМСО – диметилсульфоксид
ДРС/DLS – метод динамічного розсіювання світла
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
ЛФ – лужна фосфатаза
MMP/MDR – множинна медикаментозна резистентність клітин
НЧ – наночастинки
ПЕГ/PEG – поліетиленгліколь
ПН/PC – полімерний носій
VER-co-GMA – 2-трет-бутилперокси-5-метил-1-гексан-3-іну
PEGMA-co-DMM – диметилмалеат (DMM) та макромер полі(етиленгліколь)-метилетиловий ефір-метакрилат (ПЕГМА)

ВСТУП

Останніми десятиліттями суттєво зріс інтерес до використання багатофункціональних наноматеріалів у біомедичних дослідженнях і лікуванні. Завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям ці нанорозмірні матеріали мають значний потенціал для доставки ліків, діагностичних агентів і генетичних матеріалів до специфічних клітин або тканин. У контексті хіміотерапії раку наносистеми можуть забезпечити цілеспрямовану доставку протипухлинних препаратів безпосередньо до пухлинних клітин, підвищуючи ефективність лікування, покращуючи біосумісність і зменшуючи побічні ефекти шляхом зниження токсичного впливу на здорові органи й тканини (Wang J, 2021).

Наночастинки (НЧ), які використовують для доставки ліків, можуть бути виготовлені з різних матеріалів, зокрема природних або синтетичних полімерів, ліпідів, металів, тощо. Використання нанорозмірних носіїв забезпечує захист фармацевтичних молекул, подолання біологічних бар'єрів, контролюване вивільнення лікарських речовин в організмі та покращену циркуляцію препаратів у кровотоці. Це сприяє покращенню фармакокінетичних характеристик завантаженого препарату, що, в свою чергу, підвищує терапевтичну ефективність і знижує ризик побічних ефектів. Системи на основі наноматеріалів широко використовують як потенційні носії ліків для ефективного лікування онкологічних захворювань (Pillai G, 2014). Хіміотерапія з використанням наночастинок має значні переваги, такі як стабільність, специфічність, підвищену здатність завантаження лікарських речовин, покращене контрольоване вивільнення ліків та можливість транспортувати як гідрофобні, так і гідрофільні біоактивні сполуки (Sharma DK, 2025).

Попри чисельні переваги багатофункціональних наноматеріалів, головною перешкодою для їхнього впровадження залишається недостатня біосумісність і обмежена біодеградабельність (Zhu J, 2025). Тому актуальним є пошук нових нанорозмірних носіїв для модуляції дії традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів, що дозволить покращити їхню терапевтичну

ефективність і зменшити негативні побічні ефекти. З'ясування молекулярних механізмів дії таких комплексів є важливим для застосування у подальших дослідженнях на тваринах та впровадження у клінічну практику.

Актуальність теми.

Попри величезний технологічний прогрес, досягнутий в останні десятиліття, сучасна хіміотерапія раку досі не позбавлена ряду недоліків, а саме: а) значні побічні ефекти традиційних лікарських засобів, таких як доксорубіцин (Linhares BG, 2025), цисплатин (Liu H, 2025), паклітаксел (Qiao JX, 2024); б) короткотривалі ефекти від застосування новітніх таргетних протипухлинних препаратів, зумовлені швидким розвитком набутої стійкості злоякісних клітин до засобів хіміотерапії (Xiao H, 2025). Одним із найперспективніших напрямків для усунення вищезгаданих недоліків ліків є застосування нанорозмірних систем для цілеспрямованої доставки ліків у злоякісні клітини. Такий підхід дозволяє оптимізувати ефективність дії ліків і мінімізувати їхні побічні ефекти на здорові тканини і органи (Zhu J, 2025).

За останні десятиліття було розроблено багато систем доставки ліків, що ґрунтуються на використанні наночастинок мінеральної природи (на основі Au, Ag, Fe₂O₃), ліпосом, а також полімерів різної структури (Cheng Z, 2025; Theodosis-Nobelos P, 2025; Noreen S, 2025). Однак, більшість з них так і не було впроваджено у клінічну практику через вади їхньої дії.

Агенція з продовольства і медикаментів США (FDA) затвердила всього 7 систем доставки протипухлинних засобів, більшість з яких базується на модифікованих ліпосомах, і одна (AbraXane®) використовує людський альбумін як природний носій (Pillai G, 2014). Саме тому, розробка та подальше впровадження у клінічну практику новітніх систем доставки ліків, здатних посилювати протипухлинну дію, долати набуту стійкість пухлин до хіміотерапії та водночас зменшували негативні побічні ефекти цих ліків на нормальні клітини організму, залишається актуальним завданням сучасної фармакології та медицини.

Для досягнення мети роботи, ми використали такі полімерні наносистем: 1) полімерні наноносії на основі N-вінілпіролідон-5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-

гексен-3-ін-гліцидилметакрилату; 2) розгалужені полімерні носії: а) полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-МПЕР; б) полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-ПОР; в) полі(ПЕРМА-ко-ДММ), що містять ланки полі(етиленгліколь)-метилетилметакрилату (ПЕРМА) та диметилмалеату (ДММ); г) наночастинки на основі оксиду заліза (ІІІ), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном). Різні хімічні склади та підходи до синтезу дозволяють контролювати структурні та молекулярно-масові характеристики нових розгалужених кополімерів, їхню міцелізаційну здатність та колоїдно-хімічні властивості, що впливають на біосумісність. Кожен з цих типів наноматеріалів володіє такими важливими характеристиками, як біосумісність, здатність до високого навантаження медикаментозними чинниками та стабільність у водних розчинах протягом тривалого часу (до 30 днів), що робить їх перспективними кандидатами для застосування у клінічній практиці. Дані наносистеми були розроблені в рамках співпраці відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України, де виконувалася дисертаційна робота, з іноземними та вітчизняними партнерами, а саме з групою проф. О.С. Заїченка (Національний університет «Львівська політехніка») та групою доктора Даніеля Горакка (Інститут макромолекулярної хімії Чеської АН).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Представлена робота виконана як частина фундаментальних досліджень відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України за темами: «Роль імуномодуляторної активності у протипухлинній дії традиційних та експериментальних медикаментозних препаратів за їх доставки полімерними наноносіями до різних клітин-мішеней *in vitro* та *in vivo*» (відомча тема, № держреєстрації 0122U002240, 2022-2024 рр.), «Посилення біологічної активності берберин-подібних алкалоїдів шляхом їх ковалентної і нековалентної модифікації» (НДР за бюджетною програмою «Підтримка розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень», № держреєстрації 0122U002241, 2022 р.), «Підвищення ефективності дії традиційних та експериментальних лікарських препаратів *in vitro* та *in vivo* шляхом їх іммобілізації на нанорозмірних носіях і

поєднання з антиоксидантами» (відомча тема, № держреєстрації 0117U000786, 2017-2021 рр).

Мета і завдання дослідження.

Метою роботи було: 1) дослідження молекулярних механізмів дії *in vitro* новітніх систем доставки ліків з іммобілізованими на них традиційними та експериментальними протипухлинними препаратами та вивчення їх терапевтичної ефективності *in vivo* на експериментальних моделях пухлин піддослідних тварин; 2) вивчення біосумісності досліджуваних наноматеріалів різної природи як потенційних носіїв для адресної доставки лікарських засобів.

Відповідно до визначеної мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити механізми протипухлинної дії нанокомпозиту, що складається з антиоксиданта N-стеароїлетаноламіну (NSE) і доксорубіцину, іммобілізованих на синтетичному полімерному наноносії (poly(VEP-GMA)-graft-PEG).
2. Оцінити дозозалежне посилення терапевтичної активності доксорубіцину по відношенню до пухлин різного типу за допомогою ко-іммобілізованого N-стеароїлетаноламіну, та вивчити ефект функціоналізації полімерної платформи для зменшення токсичного впливу на організм.
3. Дослідити протипухлинну дію берберину та його нанорозмірних комплексів, їхню цитотоксичну активність щодо нормальних та злоякісних клітин ссавців, а також ефективність лікування мишей з меланою B16/F10 дикого типу.
4. Оцінити протипухлинний потенціал 9-О-октил-берберину та його нанорозмірних комплексів, молекулярні механізми їх дії та терапевтичний ефект на організм мишей з експериментальними пухлинами.
5. Оцінити біосумісність наноматеріалів, зокрема нових полімерів різної структури та молекулярної маси для потенційного застосування в якості нанорозмірних носіїв для доставки ліків.
6. Дослідити протипухлинну активність нових наночастинок на основі оксиду феруму (III), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном) як потенційних систем для доставки медикаментозних засобів.

Об'єкт дослідження – цільова доставка традиційних і експериментальних протипухлинних препаратів багатофункціональними наноматеріалами для та їхній вплив на різні типи клітин в експериментальних моделях *in vitro* й *in vivo*.

Предмет дослідження - оцінка цитотоксичної, апоптичної дії досліджуваних наноматеріалів, їхнього впливу на антиоксидантний стан псевдонормальних і пухлинних клітин, а також їхньої біосумісності в організмі лабораторних мишей.

Методи дослідження – у роботі використано методи клітинної біології і цитології (культивування клітин, проточна цитофлуориметрія, світлова і флуоресцентна мікроскопія). Крім того, застосовували електрофорез в поліакриламідному гелі і Вестерн-блот аналіз клітинних білків, прищеплення пухлинних клітин тваринам *in vivo*, визначення показників гематологічного та біохімічного профілю (визначення активності ензимів і концентрації метаболітів) у піддослідних тварин і статистичне опрацювання результатів дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. Оцінено здатність нових полімерних гребенеподібних носіїв знижувати лікувальну дозу традиційних протипухлинних препаратів (доксوروبіцин) та підвищувати біодоступність експериментальних лікарських засобів (берберину, похідне 9-О-октил-берберину) у піддослідних лабораторних тварин (миші). Встановлено, що застосування нанорозмірних полімерних носіїв для доставки доксوروبіцину посилює його протипухлинну дію та зменшує негативні побічні ефекти в організмі. Досліджено молекулярні механізми, що визначають здатність нанокомпозитів на основі N-вінілпіролідону, функціоналізованих цитопротекторним ліпідом N-стеароїлетаноламіном, посилювати цілеспрямовану дію протипухлинного препарату доксوروبіцину *in vitro* та *in vivo*. Виявлено унікальну біфункціональність синтетичного канабіміметика NSE, який виявляє проапоптотичну дію на пухлинні клітини *in vitro* та пригнічує ріст пухлин *in vivo*. Водночас, у комплексі з полімерним носієм, NSE проявляє біопротекторний ефект щодо токсичної дії доксوروبіцину в організмі мишей, зокрема зменшує його кардіотоксичність у мишей.

Застосування наноконплексів значно покращує розчинність водонерозчинних протипухлинних препаратів, підвищує їхню біодоступність і пролонгує терапевтичний ефект. Це особливо актуально для напівсинтетичних похідних алкалоїдів, зокрема у лікуванні меланоми B16/F10 у мишей.

Результати дослідження біосумісності різних наноматеріалів, зокрема полімерних носіїв різної хімічної будови та молекулярної маси, вказують на безпечність їхньої дії як *in vitro*, так і на рівні організму.

Розроблені mag.SLPs частинки на основі оксиду феруму продемонстрували багатообіцяючі характеристики, що робить їх перспективними для застосування у протипухлинній терапії, зокрема для подолання множинної резистентності пухлин до дії медикаментів.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження мають важливе значення у сфері експериментальної онкотерапії. Розроблено та обґрунтовано нові підходи для підвищення ефективності протипухлинних препаратів, створених за допомогою нанотехнологій. Зокрема, встановлено, що іммобілізація доксорубіцину на нанорозмірному носії, функціоналізованому ліпофільним цитопротектором N-стеароїлетаноламіном, сприяє збільшенню проникності протипухлинного препарату у клітини-мішені та подоланню набутої медикаментозної резистентності. Також доведено, що амфифільні полімерні носії значно підвищують біодоступність і терапевтичну активність алкалоїду берберину, що відкриває нові можливості для його застосування в лікуванні онкозахворювань.

Практичне значення дослідження також полягає у розробці перспективних наноконпозитних лікарських форм, які можуть бути використані у клінічній онкології. Запропоновані підходи дозволяють зменшити негативні побічні ефекти хіміотерапії (кардіотоксичність, гепатотоксичність), підвищити ефективність протипухлинних засобів та покращити результати лікування. Оцінка безпечності розроблених полімерних наноматеріалів підтвердила їхню високу біосумісність, що є важливим критерієм для подальшого впровадження у медичну практику. Результати роботи сприяють розвитку наномедицини та можуть бути використані

для вдосконалення методів доставки протипухлинних препаратів для застосування у персоналізованій терапії онкологічних хворих.

Особистий внесок здобувача. Скорохід Н.Р. самостійно підготувала та опрацювала наукову літературу за темою дисертації. Спільно із науковим керівником, член-кореспондентом НАН України Стойкою Р.С. було розроблено план проведення досліджень і підібрано оптимальні методи виконання поставлених завдань. Основну частину експериментальної роботи дисертантка виконала самостійно. Авторкою сформульовано основні завдання дослідження, обрано об'єкти і методи дослідження. Крім того, вона сформулювала основні висновки та провела аналіз та графічне представлення отриманих результатів. Спільно із науковим керівником та співавторами за результатами досліджень підготовлено до друку наукові публікації. Флуоресцентну мікроскопію та цитофлуориметричний аналіз проведено у співпраці з д.б.н. Панчуком Р.Р. Перевивання лімфоми NK/Ly та гострого лейкозу L1210 у тварин було проведено за участі д.б.н. М.Д. Луцика. Імобілізацію N-стеароїлетаноламіну на полімерному носії N-ВП-ВЕМ-ГМА та створення нанокон'югатів берберину (Verb) і його алкілованого похідного (alcVerb) виконала д.х.н. Мітіна Н.Є. під керівництвом д.х.н. Заїченка О.С. (Національний університет «Львівська Політехніка»).

Апробація результатів дисертації.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 2 наукові роботи у фахових міжнародних журналах із сумарним імпаکت-фактором 8,7 (згідно даних Thomson Reuters за 2025 рік), 1 розділ у монографії.

Виступи на конференціях. Опубліковано 5 тез доповідей на наукових конференціях.

Зміст та обсяг роботи. Дисертація включає «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел». Текст дисертації викладено на 225 сторінках машинопису, з яких основна частина складає 136 сторінки. Робота містить 10 таблиць і 64 рисунки. Список літератури нараховує 202 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні підходи хіміотерапії раку

Захворюваність на різні види раку продовжує зростати, незважаючи на значний прогрес у розробці методів його лікування. Традиційні методи лікування раку, зокрема променева терапія, хіміотерапія та хірургічне втручання, мають суттєві обмеження, такі як побічні ефекти, зокрема пошкодження здорових клітин, а у випадку хіміотерапії – ще й розвиток множинної медикаментозної резистентності.

Сучасні терапевтичні підходи до лікування раку базуються на використанні різних класів хіміотерапевтичних препаратів. Наприклад, алкілюючі агенти, які впливають на ДНК та перешкоджають поділу клітин, залишаються одними з найпоширеніших засобів, особливо для пухлин, які повільно ростуть. Антиметаболіти, що імітують поживні речовини, спричиняють «голодування» злоякісних клітин. Рослинні алкалоїди та протипухлинні антибіотики пошкоджують білки цитоскелету або структуру ДНК, як наслідок, блокуючи поділ клітин. Окрім хіміотерапії, також застосовуються імунотерапевтичні засоби — препарати, що модулюють активність імунної системи з метою розпізнавання та елімінації пухлинних клітин, зокрема інгібітори контрольних точок, моноклональні антитіла та терапевтичні протиракові вакцини.

За останнє десятиліття терапія раку еволюціонувала від застосування цитотоксичних препаратів широкого спектру дії до впровадження препаратів адресної дії. Проте створення таких цільових методів лікування залишається складним завданням. До того ж для більшості пацієнтів така терапія залишається недоступною через її високу вартість. Крім того, таргетна хіміотерапія не завжди гарантує тривалу ремісію, навіть у разі її поєднання з традиційними методами лікування раку (Li B, 2022).

1.1.1. Таргетна хіміотерапія

Цільова терапія, або молекулярно-таргетна терапія, є інноваційним підходом до лікування раку, яка характеризується високою селективністю до пухлинних клітин. Суть її дії полягає в блокуванні росту ракових клітин через вплив на специфічні молекули, що сприяють канцерогенезу (Joo WD, 2013). На відміну від традиційної хіміотерапії, яка вражає всі швидкозростаючі клітини, цей метод діє вибірково на злоякісні клітини. У цільовій терапії акцент робиться на точковому впливі на молекули, які є критичними для розвитку і прогресії пухлини.

У таргетній терапії раку використовують препарати, що впливають на конкретний біомаркер при даному виді раку (Chang L, 2021). Таргетна онкологія включає рекомбінантні антитіла, низькомолекулярні інгібітори, кон'югати антитіл із лікарськими препаратами та методи імунотерапії. Наприклад, моноклональні антитіла трастузумаб і пертузумаб націлені на рецептор епідермального фактору росту людини 2 (HER2) і використовують для лікування HER2-позитивного раку молочної залози. Завдяки таргетній терапії значно покращилася виживаність пацієнтів із метастатичним раком молочної залози та легені (Rinnerthaler G, 2025).

У 2004 році FDA схвалила перший таргетний препарат бевацизумаб для лікування колоректального раку (Ji P, 2025) і ця подія вважається початком виникнення таргетної терапії. Подальші дослідження призвели до успішного використання моноклональних антитіл, таких як бевацизумабу та олапарибу щодо терапії раку яєчників (Alemzadeh E, 2024). Для лікування раку молочної залози активно використовують комбінацію трастузумабу з пертузумабом, а також інгібітори T-DM1 та mTOR, у поєднанні з інгібіторами ароматази (Bhagyalalitha M, 2024).

Сучасна таргетна хіміотерапія націлена на трансмембранні білки клітинної поверхні, внутрішньоклітинні білки та фактори росту. Рецептори епідермального фактора росту (EGFR) та васкулярний ендотеліальний фактор росту (VEGF) є ключовими внутрішньоклітинними шляхами, що регулюють важливі процеси у злоякісних клітинах. Фактор росту ендотелію судин (VEGF) є ангіогенним білком, який сприяє розвитку та метастазуванню пухлин. Рецептор епідермального

фактора росту (EGFR) регулює поділ, ріст і загибель клітин через кілька сигнальних шляхів. Було встановлено, що більшість тирозинкіназ EGFR та VEGFR-2 піддаються інгібуванню препаратами, схваленими FDA. Тривають дослідження щодо розробки ефективного та селективного подвійного інгібітора VEGFR-2/EGFR для лікування раку (Ibraheim MH, 2024). Останнім часом розроблені стратегії, спрямовані на блокування EGFR та VEGF, які вже знайшли широке застосування в клінічній практиці (Regales L, 2009).

Один з основних викликів таргетної терапії – розвиток резистентності пухлин до лікування. Пухлинні клітини можуть адаптуватися, активуючи альтернативні механізми, що дозволяють їм обійти вплив таргетних препаратів. Зокрема, вторинні генетично детерміновані зміни в онкобілках-мішенях можуть змінювати їхню структуру, що призводить до зниження ефективності терапії. Це явище вперше зафіксували у пацієнтів із хронічним мієлогенним лейкозом, в яких розвинулася резистентність до іматинібу через мутації в мішені цього препарату (Gorre ME, 2001).

Щоб вирішити цю проблему, дослідники розробляють різні стратегії боротьби з множинною лікарською стійкістю. Однією з них – комбінування різних таргетних препаратів, що допомагає зменшити ризик адаптації пухлинних клітин. Наприклад, клітини, які набули резистентності до іматинібу, можуть залишатися чутливими до іншого інгібітора тирозинкінази, такого як дазатиніб. Інший підхід – використання препаратів, що діють на нижчі рівні сигнальних шляхів. Наприклад, при резистентності пухлин до вемурафенібу (інгібітор мутованого BRAF) можуть застосовуватися інгібітори сигнальних молекул MEK 1/2 або ERK 1/2, що допомагає блокувати пухлинний ріст навіть за наявності мутацій (Atefi M, 2011).

Однак, навіть застосуванням нових підходів не гарантує тривале збереження ефективності лікування, а також значно підвищує його вартість. Крім того, комбіноване лікування або використання нових молекул може супроводжуватися появою додаткових побічних ефектів, які потребують ретельного контролю.

Незважаючи на ці виклики, таргетна терапія залишається ключовим напрямом у сучасній онкології, зокрема у лікуванні метастазуючих пухлин. Хоча проблема розвитку резистентності та побічних ефектів все ще актуальна, кількість молекулярно-таргетних препаратів, схвалених FDA постійно зростає. Це дає підстави для оптимізму щодо покращення результатів лікування та збільшення тривалості життя пацієнтів із онкологічними захворюваннями (Terro HR, 2017).

1.1.2. Комбінована хіміотерапія

Комбінована терапія може включати різні підходи, зокрема хірургічне втручання, променеву або імунотерапію в поєднанні з хіміотерапією. Також можливе застосування комбінацій препаратів, що впливають на кілька сигнальних шляхів карцерогенезу. Наприклад, поєднання інгібіторів циклін-залежних кіназ (CDK) із препаратами, спрямованими на фактори росту (Bhatia K, 2020). При такій терапії особливе значення має встановлення оптимальних доз, співвідношень і схем застосування комбінацій лікарських засобів (Goldin A, 1980). Важливим аспектом є використання препаратів, що сприяють посиленню дії активних сполук. Дозозалежна реакція відіграє ключову роль, оскільки залежно від концентрації препарати можуть як стимулювати, так і пригнічувати різні біологічні процеси, включаючи апоптоз і міграцію клітин. Це підкреслює важливість точного дозування при використанні комбінованої метроромної хіміотерапії. Зокрема, досліджувалися метроромні режими хіміотерапії із застосуванням вінорельбіну (NVB) у поєднанні з цисплатином (CDDP) або фторурацилом (5-FU). Результати показали, що низькі дози цих препаратів можуть стимулювати ріст пухлини та метастазування через посилення ангіогенезу та активацію супресорних клітин, тоді як високі дози пригнічують ці ефекти, зменшують ріст пухлини (Bhatia K, 2020; Liu H, 2024).

Перспективним напрямом є багатоцільова хіміотерапія, що реалізується через комбіноване застосування медикаментозних препаратів, одночасної доставки кількох терапевтичних агентів або створення гібридних молекул, що містять векторні антитіла до поверхневих антигенів ракових клітин. Гібридні препарати,

які одночасно впливають на ключові точки сигнальних шляхів і різноманітні структури пухлинних клітин, є об'єктом інтенсивних досліджень (Szumilak M, 2021). Такі препарати здатні одночасно впливати на кілька мішеней, залучених у регуляцію проліферації ракових клітин. Вони характеризуються спрощеним фармакокінетичним профілем, що знижує ризик лікарських взаємодій, полегшує процес розробки та підвищує ефективність хіміотерапії. Завдяки полегшеній схемі лікування такі засоби зменшують кількість негативних побічних ефектів та токсичність у порівнянні із стандартними комбінованими методами. Таким чином, створення гібридних молекул із різними хімічними структурами та функціями є перспективним підходом для подолання множинної медикаментозної резистентності (Debela DT, 2021).

1.2. Механізми виникнення множинної медикаментозної резистентності пухлин та шляхи її подолання

Розвиток множинної медикаментозної резистентності (MDR) до хіміотерапії продовжує бути основною проблемою у лікуванні раку. Резистентність може розвиватися до кожного протипухлинного препарату та обумовлена різними механізмами, зокрема зменшенням поглинання препарату, підвищенням виведенням ліків, активацією детоксикаційних систем, посиленням механізмів репарації ДНК, а також уникненням апоптозу, індукованого лікарськими засобами (Gillet JP, 2010).

Множинна медикаментозна резистентність (ММР) пов'язана із підвищенням вмістом у мембрані клітин-мішеней білків-переносників ліків, що належать до родини АТФ-зв'язувальних касетних транспортерів (ATP-Binding Cassette, ABC transporters). Ці мембрано-асоційовані комплекси з АТФ-азною активністю виводять протипухлинні препарати зі злоякісних клітин, зменшуючи їхню ефективність. На даний час у людини ідентифіковано 48 генів ABC-транспортерів, які поділяються на сім підродин за гомологією амінокислотної послідовності та доменної структури (Gottesman M, 2002). За нормальних умов ці білки відіграють важливу роль у детоксикації ксенобіотиків у різних органах, зокрема в печінці,

тонкому й товстому кишківнику та нирках. У злоякісних клітинах гени ABC-транспортерів надекспресовані, що суттєво знижує чутливість пухлин до хіміотерапії.

Основна увага у дослідження MMR пухлин під час хіміотерапії зосереджена на трьох ключових білках: P-gp (P-глікопротеїн), MRP-1 (multidrug-resistance associated protein – білок, асоційований із множинною лікарською резистентністю) та BCRP (breast cancer resistance protein – білок резистентності раку молочної залози), незважаючи на інші типи ABC-транспортерів. Кожен із цих транспортерів характеризується специфічністю до певних субстратів. Зокрема, P-глікопротеїн зумовлює стійкість пухлин до колхіцину, дексаметазону, доксорубіцину, вінбластину і етопозиду, тоді як MRP-1 – до вінкристину і доксорубіцину (Eberl S, 2007, Munoz M, 2007). Водночас, BCRP не лише спричиняє резистентність до метотрексату й мітоксантрону, а й значно знижує ефективність таргетної хіміотерапії раку, забезпечуючи стійкість ракових клітин до іматинібу і лапатинібу (Kodaira H, 2010). Попри розробку трьох поколінь інгібіторів P-глікопротеїну та проведення численних клінічних випробувань, більшість із них не увінчалися успіхом через низку обмежень. Основними проблемами стали неспецифічна токсичність, варіабельність у рівні відповіді пухлин на інгібітори через мінливість експресії P-gp і ко-експресію інших ABC-транспортерів, а також недостатня концентрація інгібіторів у пухлинних клітинах для ефективного блокування P-gp. Крім того, фармакокінетична взаємодія інгібіторів із протипухлинними препаратами часто призводила до підвищення їхньої токсичності як у пухлинах, так і в здорових тканинах. Сукупність цих факторів значно обмежує використання інгібіторів P-gp у клінічній практиці для подолання множинної медикаментозної резистентності (Binkhathlan Z, 2013).

На сьогодні існує кілька відносно ефективних підходів для подолання медикаментозної стійкості пухлин. У таргетній терапії основним підходом залишається розробка нових препаратів, здатних інгібувати активність мутованих онкобілків. Однак цей метод має обмежений потенціал через швидку появу нових мутацій, що знову вимагає пошуку альтернативних молекул. Інгібітори ABC-

транспортерів (наприклад, верапаміл), хоча й виявляють ефективність *in vitro*, показали низьку результативність *in vivo* через значні побічні ефекти, спричинені їхнім впливом на нормальні тканини, де ці транспортери відіграють важливу роль у детоксикації. Таким чином, існує гостра потреба у створенні нових протипухлинних препаратів, здатних долати резистентність альтернативними шляхами, які поки що залишаються недостатньо вивченими.

1.3. Використання наноматеріалів у протипухлинній терапії

Для вирішення проблем, пов'язаних із терапією раку, активно застосовуються досягнення нанотехнологій (Sharma DK, 2025). Нанотехнології – це вивчення та створення матеріалів, які мають хоча б один вимір у нанометровому діапазоні. Цю галузь не дарма називають технологією майбутнього, адже вона базується на проектуванні наноструктур із застосуванням методів, що забезпечують контроль фізичних і хімічних властивостей на молекулярному рівні (Anselmo AC, 2019).

Наноматеріали, з їхнім діапазоном розмірів (1-100 нм), що відповідає основним біологічним матеріалам, таким як ДНК, а також збільшеною поверхнею (до 1000 м²/г) і унікальними механічними, електронними, фотонними й магнітними властивостями мають широкий спектр застосувань від доставки ліків і генів до біомедичної візуалізації, а віднедавна і до персоналізованої медицини. Основні переваги використання наноматеріалів як носіїв протиракових чинників є можливість цілеспрямованої доставки до пухлини, візуалізації пухлин, їх здатність утримувати тисячі молекул ліків, а також здатність подолання проблем розчинності, стабільності та резистентності. Сучасні нанотехнології вже впроваджуються в клінічну практику: деякі терапевтичні засоби проходять клінічні випробування, а окремі вже схвалені Агенцією FDA (Rashidi N, 2024).

1.3.1. Адресна доставка протипухлинних препаратів за допомогою наноматеріалів

Для ефективного лікування раку протипухлинні препарати повинні відповідати двом основним вимогам (Cho K, 2008). До них відносять:

1. Досягнення місця дії після подолання всіх біологічних бар'єрів зі збереженням своєї активності з мінімальною втратою об'єму.
2. Вибіркова дія на пухлинні клітини з мінімальним цитотоксичним впливом на здорові сусідні клітини або тканини.

Наночастинки здатні задовольняти ці вимоги, а отже, виступають як хороші системи-доставки ліків. Наноносії проникають у пухлинні тканини за допомогою двох основних механізмів (Palombo M, 2014).

1.3.2. Пасивне таргетування

Пасивне таргетування наноносіїв з медикаментозними речовинами та їх накопичення в пухлинній тканині є процесом, що залежить від розміру пухлини. Це явище обумовлене патофізіологічними особливостями пухлинних судин, зокрема їхньою підвищеною проникністю та недостатнім лімфодренажем. Екстравазація твердих частинок у пухлинну тканину та їх утримання називається ефектом посиленого проникнення та утримання (Enhanced Permeability and Retention, EPR) (Carmeliet P, 2000). Імунна система розпізнає частинки як чужорідні тіла, що призводить до їхньої опсонізації клітинами ретикулоендотеліальної системи (система мононуклеарних фагоцитів) та подальшої швидкої елімінації. Щоб запобігти цьому, застосовують наноносії, які покриті поліетиленгліколем (ПЕГ). Такий спосіб використання наночастинок підвищує біосумісність та забезпечує ефект "невидимості" для імунної системи. Цей процес називається ПЕГ-ілуванням, а самі системи доставки лікарських засобів – стелс-системами (Dabholkar RD, 2006). Контроль товщини ПЕГ-покриття та ефективності прищеплення здійснюється шляхом використання полімерних ланцюгів різної довжини та молекулярної маси. Довші ланцюги створюють більший стеричний бар'єр навколо наноносія, ніж короткі, що підвищує біосумісність препарату (Masood F, 2016).

Окрім традиційного пегільованого покриття, модифікація поверхні наноносіїв може бути здійснена за допомогою похідних ПЕГ, зокрема блок-кополімерів поліксамерного типу (Van Guyse JFR, 2024).

1.3.3. Активне таргетування

Щоб підвищити накопичення наночастинок у пухлинних клітинах, застосовують активне таргетування. Суть його полягає у взаємодії лігандів, розташованих на поверхні наночастинок, із рецепторами, що надмірно експресуються у пухлинних тканинах (Farokhzad OC, 2009).

Сайт-специфічне таргетування та проникнення в пухлинну клітину можна досягти за допомогою надмірно експресованих рецепторів клітинної мембрани пухлини та механізмів фагоцитозу (вибіркового ендоцитозу) (Farokhzad OC, 2009; Palombo M, 2014). Наприклад, рецептори трансферину, та рецептори фолієвої кислоти, що надмірно експресуються в багатьох типах раку, є перспективними мішенями для активної доставки лікарських засобів (Davis M, 2010; Daniels TR, 2012). Трансферин - це глікопротеїн, асоційований з клітинною мембраною, який бере участь у поглинанні заліза клітинами та регуляції їхнього росту. Поглинання заліза відбувається шляхом інтерналізації навантаженого залізом трансферину. Аналогічно, рецептор фолієвої кислоти є ефективною мішенню для специфічної доставки медикаментів у пухлину (Gabizon A, 2003; Zhou Q, 2011). Відомо, що щільність фолатних рецепторів збільшується зі збільшенням стадії раку. Активне таргетування також може бути здійснене шляхом націлювання на пухлинно-специфічні біомаркери або залученням механізмів, важливих для розвитку пухлини, наприклад неоангіогенезу. Одним із таких біомаркерів є СА-125, який експресується у понад 85% випадків раку яєчників для раку яєчників і використовується як мішень для терапевтичного втручання (Bonifácio VDB, 2020; Zhang M, 2021). Хоча переваги активного таргетування добре відомі, ця технологія призвела до створення лише кількох клінічно підтверджених нанопрепаратів.

1.3.4. Подолання медикаментозної резистентності ракових клітин за допомогою наноносіїв

Наночастинки (НЧ), завантажені хіміотерапевтичними чинниками, такі як ліпосоми, полімерні та ліпідні наночастинки, мають здатність долати множинну медикаментозну резистентність за такими механізмами:

- 1) Поглинання препарату клітинами шляхом ендоцитозу або рецептор-опосередкованої інтерналізації.
- 2) Інгібування білків, відповідальних за множинну медикаментозну стійкість за допомогою полімерних носіїв, таких як плюронові блок-кополімери.
- 3) Збільшення концентрації препарату навколо пухлинної клітини. Для досягнення синергічного ефекту інгібітор та препарат можуть бути одночасно завантажені в наночастинки (Karabasz A, 2020).

Імобілізація високотоксичних протипухлинних препаратів на біофункціоналізованих носіях дозволяє знизити ефективну концентрацію ліків і підвищити їхню пухлинну специфічність (Dabholkar RD, 2006). Наноносії представляють тут особливий інтерес, оскільки вони зазвичай мають більшу тривалість дії, підвищену біодоступність та зменшену кількість побічних ефектів у пацієнтів. Крім того, більшість сучасних систем доставки ліків мають таку характеристику, як можливість цільової доставки ліків до місця патологічного локалізації процесу, що відсутня у традиційних форм протипухлинних препаратів (Roma P, 2025).

Деякі наночастинки можуть долати гематоенцефалічний бар'єр до центральної нервової системи (ЦНС), що відкриває нові перспективи до лікування захворювань ЦНС та пухлин головного мозку (Chauhan M, 2024; Sultana S, 2025).

Прикладом ефективного використання наноносіїв є наночастинки золота, кон'юговані з доксорубіцином, які показали підвищене накопичення в пухлинній тканині та покращену протипухлинну активність у мишей із раком молочної залози порівняно з вільною доставкою ліків (Hasannia M, 2022).

На сьогоднішній день деякі НП були схвалені FDA для лікування різних видів раку, включаючи рак яєчників, недрібноклітинний рак легенів, саркому, гліобластому, рак підшлункової залози, лейкоз і множинну мієлому. Приклади використання наномедицини для лікування раку включають Doxil (1995), Abraxane (2005), Oncaspar (2006), Marqibo (2012), Onivyde (2015), Vyxeos (2017), NanoTherm (2010) і Hensify (2019) (Rashidi N, 2024; Pillai G, 2014). У клінічному дослідженні III фази Абраксан (наночастинки паклітакселу, зв'язані з альбуміном) показав

покращену виживаність без прогресування порівняно зі звичайним препаратом паклітакселу (РТХ) у пацієнток із метастатичним раком молочної залози (Jain M, 2016). Функціоналізація ліпосом різними молекулами, включаючи антитіла і підсилювачі проникнення в клітини, є перспективною в доклінічних моделях. Термочутливі ліпосоми (ТСЛ), зокрема лізо-термочутливий ліпосомальний доксорубіцин (ЛТЛД) та полімер-модифіковані ТСЛ, забезпечують покращену доставку доксорубіцину, тоді як ТСЛ на основі фосфатидилгліцерину (DPPG-TSL) демонструють потенціал для клінічного застосування стратегій доставки ліків на основі Doxil (Bi H, 2019; Aloss K, 2023).

Наночастинки на основі ліпідів, що доставляють мРНК-кодуючі пухлинні антигени, також показали багатообіцяючі результати в клінічних випробуваннях імунотерапії раку (Rashidi N, 2024; Pillai G, 2014; Han J, 2023; Faghfuri E, 2021).

1.4. Основні види наноматеріалів, які використовують для доставки ліків

Серед великої різноманітності наночастинок лише деякі придатні для використання в медицині (Ahlawat J, 2018). Основними властивостями, якими повинні володіти наночастинки є :

- відсутність токсичності;
- здатність транспортувати достатню кількість лікарського препарату;
- вивільнення ліків в клітині-мішені в оптимальній дозі;
- непомітність для клітин імунної системи.

Цими характеристиками найкраще володіють ліпосоми, полімерні міцели, дендримери, неорганічні наночастинки і карбонові матеріали.

1.4.1. Ліпосоми

Ліпосоми — це везикули, що складаються із зовнішнього ліпідного подвійного шару, що оточує внутрішнє водне ядро. Біологічна сумісність, амфіфільна природа та легкість модифікації поверхні дозволяють збільшити час циркуляції. Ліпосоми стали першими наночастинами, використаними для цільової доставки. Вони

нетоксичні та здатні зливатися з клітинними мембранами, забезпечуючи доставку вмісту до клітин шляхом прилипання до клітинних мембран або ендоцитозу (Ahlawat J, 2018).

Ліпосоми одержують з ліпідів природного та синтетичного походження. Найпоширенішими тут є фосфоліпіди - основний тип ліпідів біологічних мембран. У водному середовищі ліпіди формують різні структури: порожнисті вакуолі, плоскі везикули, або трубчасті утворення. Деякі ліпіди, які мають довгі гідрофобні «хвости», називають небішаровими, тому що в розчинах вони формують одношарові міцели, а не двошарові структури (Bangham A.D, 1995).

Розмір ліпосом може бути різним. Так, діаметр багатшарових ліпосом досягає 10 мкм, мінімальний діаметр одношарових ліпосом - 20-50 нм. На сьогодні ліпосоми використовують для спрямованого транспорту ДНК, білків, медикаментозних препаратів (Torchilin V, 2005).

Через проблеми зі стабільністю ліпосоми мають обмежене застосування в медицині, але їх широко використовуються в косметичних продуктах. Однак функціоналізація ліпосом за допомогою PEG значно збільшує їх час циркуляції в організмі, що підвищує ефективність доставки лікарських засобів. На сьогодні кілька ліпосомальних препаратів, таких як Doxil, Myocet і DaunoXome, отримали схвалення FDA для лікування таких захворювань, як метастатичний рак молочної залози та саркома Капоші (Pillai G, 2014).

1.4.2. Дендримери

Дендримери — це штучні полімери з унікальними властивостями, які відрізняють їх від традиційних полімерів. Їхні розміри зазвичай становлять від 1 до 10 нм, хоча спеціально розроблені великі дендримери можуть досягати 14–15 нм.

Ці структури складаються з трьох основних компонентів: 1) центрального ядра, яке інкапсулює терапевтичні або діагностичні агенти через нековалентні зв'язки; 2) гілок, що формують внутрішню дендритну структуру; 3) зовнішньої поверхні, до якої приєднуються функціональні поверхневі групи. Ці особливості

роблять дендримери перспективними для використання в медицині, зокрема у терапії та діагностиці (Sueyoshi S, 2024).

Дендримери характеризуються такими властивостями, як низька в'язкість, висока розчинність, здатність до змішування та висока реакційна здатність. Для лікування раку було розроблено різні типи дендримерів, зокрема поліамідоамінові (ПАМАМ), поліпропіленімінові (PPI), полі(етиленгліколь) (ПЕГ), біс-МПА (2,2-біс(гідроксиметил)пропіонова кислота), 5-амінолевулінову кислоту (5-АЛК) та триетаноламін (ТЕА) (Ahlawat J, 2018).

У хіміотерапії раку дендримери можуть доставляти ліки двома способами: 1) шляхом фізичної інкапсуляції, коли молекули ліків утримуються внутрішньою дендритною структурою; 2) шляхом хімічної кон'югації, коли молекули ліків хімічно зв'язуються з поверхневими групами або іншими компонентами дендримерів, утворюючи кон'югати полімер-ліки. Ці підходи забезпечують підвищену ефективність доставки ліків і зменшують побічні ефекти, спрямовуючи препарати безпосередньо до ракових клітин.

Перевагами дендримерів є висока мультивалентність, легкість модифікації поверхні та контроль розміру. Однак їх використання обмежують проблеми біосумісності та біорозподілу (Janaszewska A, 2019). Разом з тим, дендримери залишаються перспективними для розробки багатофункціональних систем доставки ліків, попри необхідність подальших досліджень їхньої безпечності та ефективності.

1.4.3. Полімерні наноматеріали

Полімерні наночастинки використовуються для контрольованого вивільнення лікарських засобів, підвищуючи терапевтичний індекс шляхом підтримки концентрації ліків у межах терапевтичного вікна протягом тривалого періоду часу. Завдяки біодеградабельності полімерів, таких як PLGA, ці наноматеріали безпечно метаболізуються та виводяться з організму. Крім того, їх фізико-хімічні властивості можна модифікувати, змінюючи склад полімеру та молекулярну масу, що дозволяє

створювати системи для цільової доставки ліків і контрольованого вивільнення в мікросередовищі пухлини (Mukhopadhyay B, 2024).

1.4.3.1. Структура комплексів медикаментозних засобів із полімерними наноматеріалами

У 2002 році Дішер і Айзенберг описали структуру полімерних наночастинок (Discher DE, 2002). Вони стверджують, що він має структуру «ядро-оболонка», внутрішня частина якої складається з полімерної матриці, що містить гідрофобний препарат, а поверхня складається з гідрофільного полімеру, наприклад PEG, PVP, який забезпечує стеаричну стабільність, знижує імуногенність і фагоцитоз наночастинок ретикулоендотеліальною системою. В іншому дослідженні група Алонсо показала, що покриття наночастинок PLA ПЕГ збільшує час їх перебування в шлунково-кишковому тракті шляхом захисту від ензиматичної деградації (Vila A, 2004). Враховуючи це, полімерні наночастинок можуть існувати як нанокапсули, або наносфери.

Нанокапсули складаються з ліпідного ядра та полімерної оболонки, де медикаментозний засіб може бути як інкапсульований у ядрі, так і адсорбований на поверхні. Наносфери складаються з полімерного матеріалу, в якому препарат може бути утриманий або адсорбований у полімерній структурі. Обидві системи використовують для контрольованої доставки лікарських засобів, покращуючи їх стабільність та ефективність.

Полімерні наноматеріали можуть бути синтетичними (наприклад, PLGA, PCL, PEG) або мати природне походження (наприклад, хітозан, альгінат, желатин). Синтетичні полімери забезпечують контрольоване вивільнення ліків і високу стабільність, тоді як природні полімери відзначаються біосумісністю та нетоксичністю, що робить їх перспективними для застосування в наномедицині (Kumar A, 2010).

До синтетичних полімерів належать кополімер N-(2-гідроксипропіл)-метакриламід, поліетиленгліколь, полі-L-глутамінова кислота, полі (молочно-ко-гліколева кислота), полі (себацінова кислота), полі (акрилова кислота) тощо (Xia

W, 2021). Ці матеріали мають високу стабільність, можливість контролювати розмір частинок та легко модифікуються для різних умов доставки. Управління з контролю за продуктами і ліками США (FDA) схвалило для використання полі (молочно-ко-гліколева кислота) і полі (молочна кислота). Полі (гліколева кислота) була першим синтетичним полімером, використаним для створення кон'югатів. Кон'югат N-(2-гідроксипропіл) метакриламід з доксорубіцином (протеїн-серинова кінназа-1) був протестований на його протиракову активність (Masood F, 2016).

Такі полімери, як гепарин, альбумін, хітозан, декстран, желатин, присутні в природі і є кращими для доставки різних активних компонентів, таких як ДНК, ліки, олігонуклеотиди і білки. Наночастинки альбуміну, навантажені паклітакселем, були використані для лікування метастатичного раку молочної залози. Природним полімерним наночастинкам надають перевагу через їх менші негативні побічні ефекти, тривале вивільнення ліків і збільшений час перебування в організмі (Rashidi N, 2024).

1.4.3.2. Полі (2-оксазоліни) (РОх)-перспективна платформа для створення полімерних наноматеріалів

Поліоксазоліни (РОх) – це клас синтетичних полімерів, які привернули увагу в галузі доставки ліків завдяки своїм унікальним властивостям, зокрема низькій токсичності і високій біосумісності. Полі(2-оксазоліни) мають характеристики, подібні до полі(етилєнєгліколю), однак їхній потенціал як носіїв медикаментозних засобів залишається недостатньо вивченим. РОх використовували в різноманітних системах доставки ліків, зокрема для транспортування білків і нуклеїнових кислот, для збільшення часу циркуляції медикаментозного засобу та підвищення його біодоступності. Одним із перспективних напрямів є розробка поксильованих стелс-наноносіїв, здатних уникати розпізнавання імунною системою та покращувати ефективність доставки ліків (Van Guyse JFR, 2024).

Полі(2-оксазоліни) можуть також бути використані для формування міцел і наночастинок. На відміну від попередніх підходів, полімерні міцели використовують для доставки погано розчинних (гїдрофобних) лікарських засобів

без необхідності хімічного зв'язування сполуки. Для утворення міцел може використовуватись самозбірка кополімерів, які містять як гідрофільні, так і гідрофобні ділянки (Kabanov A, 2002).

Наноформа паклітакселу (PTX) на основі РОх долає проблему низької розчинності препарату (розчинність становить до 45 г/л), забезпечує високе завантаження (50% маси), покращену стабільність і підвищену доступність до пухлинної тканини (Zhijian, 2016). Доклінічні дослідження підтвердили її безпеку, вищу допустиму дозу та покращену терапевтичну ефективність, особливо в агресивних моделях раку, таких як T11 клаудин-негативний рак молочної залози у мишей. Ці результати створюють основу для подальших клінічних випробувань (Qiao JX, 2024).

1.5. Багатофункціональні наноматеріали для доставки ліків в організмі: структура і переваги перед традиційними наноматеріалами

Головні принципи молекулярного дизайну багатофункціональних наноматеріалів виклав Торчілін (Torchilin VP, 2014). Основними функціональними модулями, які входять до структури таких систем є:

- модуль активного лікарського засобу, який здатний діяти на специфічні молекулярні мішені в клітинах під час розвитку патології;
- модуль розпізнавання специфічних клітин-мішеней в організмі. Прикладом може бути моноклональні антитіла чи пептиди, які взаємодіють з специфічними антигенами, що часто надмірно експресуються в пухлинних клітинах;
- захисний модуль, який запобігає ензиматичному розщепленню та ресорбції ретикуло-ендотеліальною системою організму. Найчастіше цю функцію виконує ПЕГ;
- модуль для вивільнення медикаментозної субстанції в ендосомах клітини-мішені, дія якого залежить від рН (оптимальне значення становить 5,2) і зумовлена гідролізом гідразонового зв'язку;

- модуль для вивільнення медикаментозної субстанції з ендосом під час їх дозрівання до лізосом, що поєднує протоновані (нейтралізовані) карбоксилати і гідрофобні групи)

- модуль для вивільнення медикаментозної субстанції в цитоплазмі, де зв'язок між платформою носія і медикаментозною одиницею руйнується під дією цитозольного глутатіону;

- опційний модуль для виявлення нанокон'югату в тканині, зазвичай представлений флуоресцентним барвником.

На рис. 1 представлено графічну схему таких лікарських засобів у комплексі з багатофункціональним носієм (Torchilin VP, 2014).

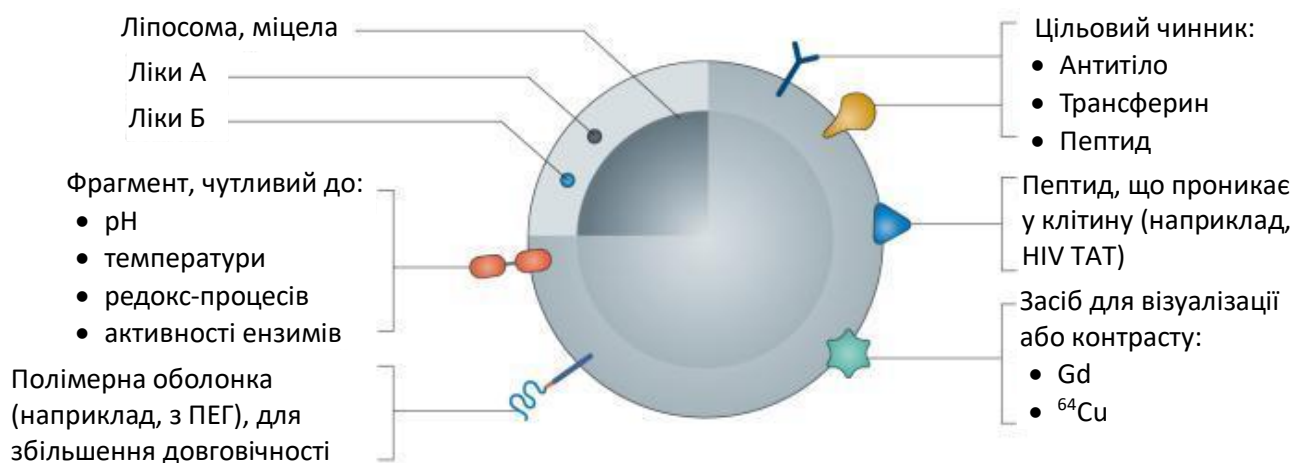


Рис. 1. Схема багатофункціональної, чутливої до стимулів фармацевтичної системи доставки ліків (NDDS), навантаженої медикаментозним засобом

Медикаментозні засоби (засіб А і засіб В) можуть бути завантажені у фармацевтичний наноносій, такий як ліпосома або полімерна міцела. Залежно від призначення наночастинок фармацевтичної системи доставки ліків (NDDS), до наночастинок можуть бути додані різні чинники, щоб націлити NDDS на певну тканину, збільшити проникнення в клітини, забезпечити візуалізацію або вивільнити ліки у відповідь на певний стимул.

Використання NDDS дозволяє подолати кілька проблем, пов'язаних з традиційними препаратами, таких як погана розчинність у воді, низька

біодоступність і неспецифічний розподіл в організмі. Сучасні систем доставки медикаментозних засобів на основі наночастинок (NDDS) можуть мати функції для подолання різних фізіологічних бар'єрів і забезпечення прицільної доставки препаратів до органів, тканин або патологічних зон. Вони забезпечують високе навантаження ліків, подовжений час циркуляції (завдяки полімерним покриттям), а також специфічне або неспецифічне націлення - наприклад, через ефект EPR або лігандні взаємодії. Деякі NDDS реагують на зміни в патологічній ділянці, як-от pH, температура чи окислювально-відновні умови, а також реагувати на надмірну експресію певних біологічних молекул (Debela DT, 2021).

1.5.1. Застосування поліетиленгліколю у багатофункціональних наноматеріалах.

Накопиченню наночастинок в клітинах-мішенях сприяє їх тривала циркуляція в кровоносному руслі. Проте при внутрішньовенне введення часто призводить до їх швидкого виведення з кровотоку та накопичення переважно в клітинах печінки і селезінки. Більше того, наночастинки оточуються білками крові (білкова корона) і поглинаються клітинами імунної системи. Для подовження часу циркуляції в кровотоці та уникнення поглинання клітинами імунної системи на поверхню наночастинок наносять полімер поліетиленгліколь (ПЕГ), що формує захисний гідрофобний шар та перешкоджає опсонізації. ПЕГ є водорозчинним полімером та має низьку молекулярну масу, робить його хорошим кандидатом для фармакологічних застосувань.

У 1977 році Абуховський та інші вперше кон'югували монометокси-ПЕГ (мПЕГ) з бичачим сироватковим альбуміном для зниження імунної відповіді. Це відкриття стало основою для створення ліків із меншими побічними ефектами, особливо в хіміотерапії. Завдяки своїм властивостям ПЕГ широко використовують для модифікації білків і створення фармацевтичних препаратів. ПЕГ також має низький рівень опсонізації і тривалий час циркуляції в крові, що дозволило Агенції FDA схвалити у 1990 році перший ПЕГ-ілований білок. Станом на 2023 рік, FDA

схвалено 40 ПЕГ-лованих фармацевтичних препаратів, 31 з яких базуються на використанні білків (Akhtar S, 2019).

ПЕГ є синтетичним гідрофільним полімером оксиду етилену, покращує розчинність і стабільність сполук, проте має недоліки. Виявлено несприятливі ефекти, такі як токсичність, імуногенність та побічні реакції (Jokerst JV, 2011). Зокрема, ПЕГ-гіловані терапевтичні засоби можуть викликати реакції гіперчутливості, змінювати фармакокінетику та фармакодинаміку препаратів, а також впливати на імунну систему через антитіла до ПЕГ. Поширеність анти-ПЕГ-антитіл серед населення зросла в епоху вакцинації мРНК на основі LNP після COVID. Велика частина населення вже мала імунну відповідь на ПЕГ у зв'язку з його широким застосуванням. Наведено докази наявності вже існуючих та індукованих лікуванням антитіл до ПЕГ. Огляд 29 досліджень показав побічні ефекти через ПЕГ-гілування терапевтичних засобів, такі як гематологічні ускладнення, печінкова токсичність, інфекції. Також спостерігають зміни фармакокінетики, такі як підвищення кліренсу та зниження активності препаратів. Імуногенні реакції, зокрема антитіла до ПЕГ і гіперчутливість, впливають на безпеку лікування. ПЕГ може змінювати структуру білків, відкриваючи нові епітопи для імунної системи, що потребує збалансованого підходу до його застосування (Fang JL, 2022).

Пошук заміни ПЕГ, який широко застосовують як функціональний елемент більшості систем доставки ліків і генів (Ljubimova JY, 2017 рік), зумовлений необхідністю запобігти резорбції цих систем клітинами ретикулоендотеліальної системи. Незважаючи на це, PEG залишається "золотим стандартом" полімера для систем доставки ліків (NDDS) з тривалою циркуляцією. Для замінити ПЕГ та зменшення ризиків також використовують альтернативи гідрофільних полімерів, такі як полі(N-(2-гідроксипропіл)метакриламід) (Whiteman KR, 2001), полі(акрилоїлморфолін), полі- N -вінілпіролідони (Torchilin VP, 2001) і полівініловий спирт (Takeuchi H, 2001).

1.6. Використання полімерних наноматеріалів у хіміотерапії раку

Полімерні наноносії є одними з найактивніше досліджуваних систем у сучасній нанофармакології (Xia W, 2021). Вони є перспективними у терапії раку завдяки своїм унікальним характеристикам, що сприяють покращенню доставки та ефективності протипухлинних препаратів (Yu Z, 2023). Полімерні наноносії мають високу біосумісність і можуть розщеплюватися в організмі, що знижує ризик токсичних реакцій. Вони поєднують необхідні властивості наноносіїв, відповідаючи специфічним вимогам до систем доставки лікарських засобів. Ефективні системи доставки лікарських засобів повинні поєднати дві протилежні характеристики: наноліки повинні бути стабільними, зберігаючи свою хімічну структуру протягом визначеного часу, і водночас мати здатність до біодеградації (Geszke-Moritz M, 2024; Karabasz A, 2020).

Відповідно до оглядової статті V.P. Torchilin (2006) (Torchilin VP, 2006) , основними вимогами до систем доставки лікарських засобів є:

- 1) пролонгована циркуляція у крові; що дозволяє накопичуватись в осередках патологічного процесу, завдяки ефекту проникності судин;
- 2) специфічне націлювання, що забезпечує ефективне транспортування активних молекул безпосередньо до клітин та органел;
- 3) функціоналізація поверхні полімерних наноносіїв для покращеного проникнення у клітини, що підвищує біодоступність медикаментозних засобів;
- 4) посилене внутрішньоклітинне проникнення завдяки застосуванню поверхнево-активних молекул, що сприяють ефективному поглинанню клітинами;
- 5) можливість транспортування контрастних агентів для точного моніторингу накопичення лікарських засобів у патологічних зонах;
- 6) стимул-чутливість, що забезпечує контрольоване вивільнення препаратів залежно від фізіологічних умов організму;

Контрольоване вивільнення лікарських засобів гарантує стійкий терапевтичний ефект і мінімізує негативні побічні ефекти. Цільова доставка, що забезпечується модифікаціями поверхні, підвищує ефективність лікування та зменшує пошкодження здорових тканин (Beesh JR, 2013). Інкапсуляція лікарських

засобів у полімерні наноносії захищає їх від деградації, підвищуючи стабільність і терапевтичну ефективність. Полімерні наноносії також можуть транспортувати кілька терапевтичних агентів одночасно, що відкриває можливості для комбінованої терапії раку (Sun L, 2023).

Як носії можна використовувати альбумін, поліетиленгліколь (ПЕГ) або N--(2-гідроксипропіл)метакриламід (HPMA). Прикладом медикаментозних препаратів на основі нанокомпозитів є Abrahane - полімерна наночастинка паклітакселу, яку використовують для лікування злоякісних пухлин молочної залози (Xiao X, 2022). Полімерні міцели, що складаються з гідрофобного ядра та гідрофільної оболонки, широко застосовують для транспортування нерозчинних у воді лікарських засобів. Серед міцелоутворювальних носіїв особливої уваги набувають амфіфільні кополімери, що поєднують гідрофобні та гідрофільні блоки (Torchilin VP, 2007). До міцелоутворювальних полімерів належать сполуки на основі ПЕГ, які демонструють високу ефективність у нанофармакології. Дендримери, що представляють собою сильно розгалужені макромолекули, є ще одним перспективним класом полімерних наноносіїв, найбільш поширеним серед яких є поліамідоамін (Kitchens K.M, 2007).

Досліджено нові гребенеподібні полімерні та олігомерні носії лікарських засобів, які поєднують основний ланцюг кополімеру 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-іну та гліцидилметакрилату з бічними ланцюгами поліетиленгліколю різної довжини. Ці нанорозмірні системи доставки водорозчинного протипухлинного препарату доксорубіцину, продемонстрували покращену доставку та зменшення токсичності *in vivo* (Senkiv Y, 2014).

Біорозкладані синтетичні полімери, які зазвичай використовують для доставки ліків, а саме PLA і PLGA, були схвалені Управлінням з контролю за продуктами й ліками США (FDA) (Hickey J.W, 2015; Zielinska A, 2020) через їх підтверджену безпечність та біосумісність, а також низький рівень імуногенності та токсичності, а їхні розкладані олігомери в організмі легко виводяться через загальний метаболічний шлях.

1.7. Цільова доставка лікарських засобів за допомогою наночастинок

Неорганічні наночастинки (НЧ) також використовують для лікування та діагностики раку, завдяки їх унікальним фізико-хімічним властивостям, таких як контрольоване вивільнення лікарських засобів, висока біодоступність, біосумісність, стабільність і велика площа поверхні. До перспективних неорганічних НЧ належать наночастинки золота, селену, кремнезему та оксидів деяких металів.

Модифікація поверхні таких наночастинок біологічними молекулами, такими як антитіла та пептиди, дозволила покращити їх націлювання на пухлинні клітини та зменшити їх швидкий кліренс імунною системою (Zhu L, 2017; Singh A, 2019). Окрім полімерів, для розробки транспортних систем лікарських засобів застосовують також тверді ліпіди, стабілізовані поверхнево-активними речовинами (ПАР), зокрема жирними кислотами, гліцеридами та восками (Muñoz de Escalona M, 2016; Mishra V, 2018). Тверді ліпідні частинки (SLP) характеризуються біорозщепленням, біосумісністю та високою ефективністю захоплення порівняно з ліпосомами (Albuquerque J, 2015; Brezaniöva I, 2016) та простотою масштабного синтезу й стерилізації. Використання таких біосумісних SLP сприяє розширенню способів введення лікарських засобів, таких як перорального, внутрішньовенного та дермального.

Різні типи наночастинок, включаючи оксид заліза, золота, гадолінію та леговані частинки апконверсії NaYF_4 , були кон'юговані з біологічно активними молекулами для отримання багатофункціональних платформ, які поєднують терапевтичний ефект з можливістю, наприклад, візуалізації тканин (Liong M, 2008; Li Q, 2016; Kostiv U, 2017). Серед цих матеріалів лише наночастинок оксиду заліза та гадолінію володіють магнітними властивостями, що дозволяє дистанційно керувати їхнім рухом за допомогою зовнішнього магнітного поля (Truzzi E, 2017). Ця особливість робить їх дуже корисними для різних розроблених біомедичних застосувань, включаючи маркування та розділення клітин, неінвазивну магнітно-резонансну томографію (МРТ), магнітно-модульовані системи доставки ліків, регенеративну медицину та терапію раку (Mody VV, 2014; Estelrich J, 2015; Plouffe

BD, 2015; S'wie' tek M, 2019a). У лікуванні раку наночастинки оксиду заліза можуть слугувати носієм ліків або джерелом тепла під впливом змінного магнітного поля в рамках підходу локальної гіпертермії рідини (Périgo EA, 2015). На відміну від здорових тканин, пухлини характеризуються порушеною судинною системою, яка не забезпечує ефективного теплообміну і ця особливість створює передумови для застосування теплової терапії у лікуванні злоякісних захворювань. Єдиний затверджений продукт термотерапії на основі мінеральних наночастинок для лікування раку — NanoTherm®. Він містить магнітні наночастинки оксиду заліза, які вже давно використовуються для лікування залізодефіцитної анемії та як контрастні речовини для МРТ. NanoTherm® був схвалений Європейським агентством з лікарських засобів (EMA) у 2010 році для лікування рецидивної гліобластоми (GBM) за допомогою AMF, а в 2018 році отримав схвалення FDA для клінічних випробувань у США для лікування раку простати. Препарат містить колоїдну суспензію покритих аміносіланом наночастинок оксиду заліза, які вводяться трансдермально в пухлинну тканину. Основні виклики термотерапії пов'язані з доставкою та ефективним відкладенням енергії. Тепло може активувати вивільнення препарату (наприклад, ThermoDox®) або безпосередньо діяти як терапевтичний агент (NanoTherm®) (Awashra M, 2023).

Управління з контролю за продуктами й ліками США (FDA) схвалило кілька IONP для клінічного застосування: Feraheme для лікування дефіциту заліза, Combidex (у США) і Sinerem (в Європі) як контрастні агенти для МРТ, Nanotherm (MagForce) для терапії раку та Lumirem для візуалізації шлунково-кишкового тракту. Feraheme (розчин ферумокситулу для ін'єкцій) схвалено в США у 2009 році, в Канаді — у 2011 році, в Європі — у 2012 році (Rashidi N, 2024).

Попри схвалення FDA, наночастинки оксиду заліза викликають занепокоєння щодо їхньої довгострокової біотрансформації *in vivo*. При повторному застосуванні можливий їх перерозподіл у кровотік і здорові тканини, що може призводити до локальної кумуляції. Для підвищення ефективності лікування та зменшення негативних побічних ефектів доцільно вводити IONP безпосередньо в пухлину або функціоналізувати їх для цільової доставки.

Актуальним залишається створення стабільних, біосумісних і екологічно безпечних магнітних частинок з вузьким розподілом за розмірами, великою площею поверхні та високою намагніченістю.

Отже, багатофункціональні мінеральні наночастинок також мають значний потенціал для доставки лікарських засобів, тераностиці та візуалізації пухлин.

1.8. Проблеми біобезпеки у застосуванні наноматеріалів

Наноматеріали викликають значний інтерес у біології та медицині завдяки широкому спектру їх застосування в діагностиці, доставці ліків та створенні штучних органів. Водночас виникає занепокоєння щодо їх біобезпечності, оскільки на нанорівні ці матеріали можуть проявляти властивості, відмінні від їхніх об'ємних аналогів. Розмір, форма, поверхневий заряд і хімічний склад наночастинок (НЧ) впливають на їхню взаємодію з біологічними системами та клітинами зокрема (Abbasi R, 2023).

Важливими критеріями ефективності наноматеріалів *in vivo* є їхній розмір, форма та хімічний склад поверхні (Lambert BP, 2020; Bibi A, 2020; Khlebtsov N, 2010; Wang B, 2013). Було показано, що частинки < 10 нм виводяться через нирки (Tang SH, 2016); тоді як більші частинки (>10 нм) вилучаються з крові та елімінуються печінкою та системою мононуклеарних фагоцитів (MPS) (Lambert BP, 2020). Форма NM впливає на ендоцитоз та кліренс MPS (Toy R, 2014; Chithrani BD, 2006). Хімічний склад поверхні – на клітинне поглинання, утворення білкової «корони» та подальшу активацію імунної системи, а також біорозподіл. Для покращення біологічної дії на поверхню наночастинок наносять покриття (функціоналізація), що приводить до зміни їх властивості. Покриття може як знижувати токсичність шкідливих частинок, так і підвищувати її шляхом зміни біодоступності. Наприклад, ВНП функціоналізують тіолами, фосфінами й амінами, що покращують їхню водорозчинність, біосумісність і націлювання, дозволяючи закріплювати олігонуклеотиди, білки та антитіла. Для подовження циркуляції в крові та зменшення поглинання сироватковими білками й макрофагами у доставці ліків використовують поліетиленгліколь (ПЕГ) (Jokerst JV, 2011).

Контроль за вивільненням медикаментозних засобів із наночастинок, потребує постійного вдосконалення для підвищення ефективності їхньої доставки. Немодифіковані та дрібні наночастинок зазвичай більш токсичні, ніж функціоналізовані та більші за розміром частинки. Наприклад, сферичні наночастинок викликають слабшу імунну відповідь порівняно зі стрижневими. Токсичність можна зменшити шляхом хімічної модифікації, функціоналізації або створенням композитів. На неї впливають такі чинники, як хімічний склад, поверхнева енергія (гідрофобність/гідрофільність), шорсткість, розмір, покриття та агрегація, кристалічність, окислювальний стрес і продукти деградації. Оцінка ризиків здійснюється з урахуванням способу введення, місця вивільнення та потенційного ураження життєво важливих органів (легені, серце, печінка, нервова система).

Взаємодія між НП і живими системами ще не до кінця вивчена. Значна частина досліджень зосереджена на їхній цитотоксичності, генотоксичності і потенційній здатності викликати запальні реакції (Kumar V, 2017). Найчастіше вивчають такі наночастинок, як вуглецеві нанотрубки, діоксид титану та наночастинок срібла (Yuan X, 2019). Запальні реакції особливо характерні для металевих наночастинок на основі срібла або оксиду цинку, що можуть викликати хронічне запалення або аутоімунні захворювання (Summer M, 2024).

Все більше уваги приділяють з'ясуванню клітинних механізмів токсичності наноматеріалів, включаючи окислювальний стрес, запалення і мітохондріальну дисфункцію. Вивчають механізми, за допомогою яких наночастинок індукують пошкодження клітин та апоптоз (Khanna P, 2015).

На токсичність наночастинок впливають їхні фізико-хімічні властивості: розмір, форма, площа поверхні, співвідношення сторін, покриття, кристалічність та агрегація. Чим менший розмір наночастинок, тим більше співвідношення площі поверхні до об'єму, що збільшує їхню біологічну реактивність. Наприклад, високе аспектне співвідношення у нанотрубок пов'язане з вищою токсичністю, особливо в легенях. Нановолокна можуть спричиняти азбестоз, мезотеліому та рак легень (Lippmann M, 1990). Агрегація наночастинок також впливає на токсичність:

великі агломерати срібних наночастинок менш гемотоксичні, ніж дрібні (Wick P, 2007; Zook JM, 2011), хоча здатні індукувати запалення легень (Zook JM, 2011).

Наноматеріали широко використовують в промисловості, зокрема в електроніці, косметичці та доставці ліків. Дослідження оцінюють вплив аерозольних наночастинок на працівників та ризики інгаляційного впливу (Xuan L, 2020). Також вивчається вплив НЧ на довкілля, адже вони можуть потрапляти у воду, ґрунт і рослинні системи через утилізацію відходів або промислові викиди. Екотоксикологічні дослідження оцінюють вплив на водне життя, ґрунтові організми та рослинні системи (Kang M, 2023).

Особливу увагу слід приділяти довгостроковій безпеці та ефективності наночастинок, оцінюючи їхню біодеградацію та потенційне накопичення в організмі (Egbuna C, 2021).

Підсумок огляду літератури

У сучасній онкології значну увагу приділяють розробці ефективних методів лікування, спрямованих на підвищення результативності терапії та подолання медикаментозної резистентності пухлинних клітин. Зроблений нами «Огляд літератури» охоплює ключові аспекти сучасних підходів до хіміотерапії, зокрема таргетну і комбіновану терапію, а також інноваційні стратегії доставки протипухлинних препаратів.

Таргетна хіміотерапія відкриває нові можливості для лікування онкологічних захворювань, забезпечуючи вибірковий вплив на злоякісні клітини. Однак її ефективність обмежується розвитком множинної медикаментозної резистентності (ММР), що залишається однією з головних проблем у лікуванні раку. Комбінована хіміотерапія, яка передбачає використання кількох препаратів або їх поєднання з іншими методами лікування, дозволяє зменшити ймовірність розвитку резистентності та підвищити ефективність терапії.

Одним із перспективних напрямів у подоланні ММР у протипухлинній терапії є використання наноматеріалів. Наноносії дозволяють цілеспрямовано доставляти

лікарські засоби безпосередньо до пухлинних клітин, зменшуючи системну токсичність та побічні ефекти. Основні види наноматеріалів, які застосовують для доставки ліків, включають ліпосоми, полімерні наночастинки, металеві наноматеріали та дендримери. Багатофункціональні наноматеріали мають переваги перед традиційними носіями завдяки можливості одночасного транспортування кількох препаратів, покращеній біосумісності та можливості контролю вивільнення активних речовин.

Особливу увагу приділено використанню полімерних наноматеріалів у хіміотерапії раку, оскільки вони забезпечують стабільність лікарських засобів у біологічних середовищах та дозволяють оптимізувати їх фармакокінетику. Водночас, незважаючи на значні досягнення в галузі наномедицини, залишається низка проблем, пов'язаних із біобезпекою застосування наноматеріалів. Вивчення їх довгострокового впливу на організм, загальної токсичності та можливих імуногенних ефектів є важливими напрямками подальших досліджень.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Наноматеріали, використані в роботі

2.1.1. Полімерний носій на основі N-вінілпіролідон-5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-гліцидилметакрилату та його нанорозмірні комплекси з доксорубіцином.

Синтез полімерного носія описано у Додатку 3

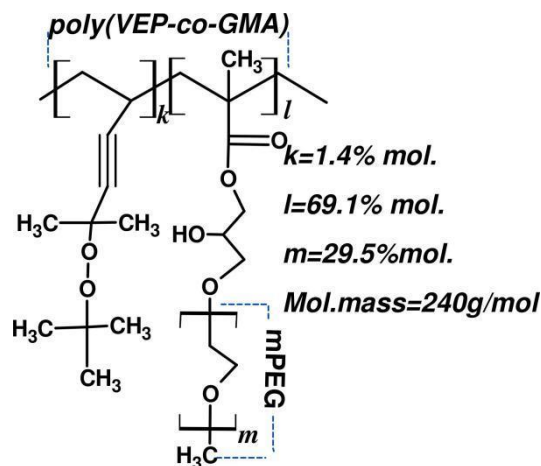


Рисунок 2. Хімічна структура полі(ВВП-ко-ГМА)-графт-мПЕГ

Приготування водної системи без Dx та NSE

Для приготування міцел на основі ПН у водних розчинах 0,09 г ПН розчиняли в 0,9 мл ДМСО. Цей розчин ПН додавали до 8,0 мл 0,9% NaCl. Потім розчин перемішували протягом 0,5 год і обробляли ультразвуком протягом 10 с. Для ультразвукової обробки використовували високочастотний пристрій УЗДН-1А (ТОВ «Укрросприлад», Суми, Україна) з перетворювачем частотою 22 кГц, потужність якого становила 40 Вт.

Приготування водної системи без Dx, але з NSE

Для приготування міцел на основі ПН та NSE у водних розчинах 0,09 г ПН розчиняли у 0,45 мл суміші ДМСО: Chl (співвідношення ДМСО: Chl = 3:1 мас.), 0,03 г NSE також розчиняли в 0,45 мл суміші ДМСО: Chl. Розчини ПН та NSE змішували. Цей розчин ПН та NSE додавали до 8,0 мл 0,9% NaCl. Потім розчин перемішували протягом 0,5 год і піддавали дії ультразвуку протягом 10 с. Розчин

перемішували при нагріванні при 40 °C протягом ще 1 год для видалення слідів хлороформу (Chl).

Приготування водної системи доставки з Dx, але без NSE

Водні дисперсії міцели ПН з Dx отримували шляхом опускання розчину Dx та ПН в ДМСО у воду в наступному порядку: 0,09 г ПН розчиняли в 0,25 мл ДМСО і 0,003 г Dx розчиняли в 0,20 мл ДМСО. Розчини ПН і Dx змішували, додавали по краплях до 8,0 мл 0,9% NaCl і піддавали дії ультразвуку протягом 10 с.

Приготування водної системи доставки з Dx та NSE

Водну дисперсію міцелярного комплексу на основі ПН та NSE, навантаженого Dx, отримували шляхом опускання пробірки з розчином Dx, ПН та NSE у воду в наступному порядку. Спочатку 0,09 г PC, 0,003 г NSE та 0,003 г Dx розчиняли в 0,2 мл, 0,15 мл та 0,10 мл суміші ДМСО: Chl, відповідно. Потім розчини змішували, додавали до 8,0 мл 0,9% NaCl та обробляли ультразвуком протягом 10 с. Потім розчин перемішували, одночасно нагріваючи при 40 °C протягом ще 1 год для видалення слідів Chl. Згодом водна дисперсія була знову піддавали дії ультразвуку протягом 10 с.

Розміри полімерних міцел ПН та комплексів ПН з Dx та NSE вимірювали за допомогою методу динамічного розсіювання світла (DLS) на приладі Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments GmbH, Штутгарт, Німеччина) та DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, Санта-Барбара, Каліфорнія, США), а також за фотонними кореляційними спектрами з використанням методу NIBS (неінвазивного зворотного розсіювання) за температури 25 °C. Зразки для DLS вимірювань готували, як описано вище, і при необхідності розбавляли бідистильованою водою, рН 6,5-7,0. Для кожного зразка проводили три-п'ять вимірювань (кожне вимірювання складалося з п'яти циклів, інтервал між вимірюваннями становив 5 хв).

Вимірювання дзета-потенціалу проводили за допомогою Zetasizer Nano ZS при фіксованій температурі 25 °C. Загалом було проведено шість вимірювань для кожної водної дисперсії і розраховано середнє значення. Дані дзета-потенціалу були відтворювані з точністю краще ніж 5%. У таблиці 1 наведено деякі колоїдно-

хімічні характеристики водних дисперсій. На рисунку 3 показано загальну схему утворення змішаної міцелярної структури.

Таблиця 1. Фізико-хімічні характеристики полімерного носія полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-мПЕГ та його комплексу з NSE і Dx.

Зразки	Com	position of the Water Dispersion mg/mL		DLS Z- Гідродинамічний діаметр (nm)	Індекс полідисперсності (PDI)	Zeta Potential, V) (m
		PC]	[NSE] Dx]			
PC		-		51 ± 16	0.35	-0.11
PC + NSE	0	0.3		420 ± 120	0.25	+4.25
PC + Dx	0	-	0.3	40 ± 9	0.06	+1.57
PC + NSE + Dx	0	0.3	0.3	680 ± 110	0.17	+6.10

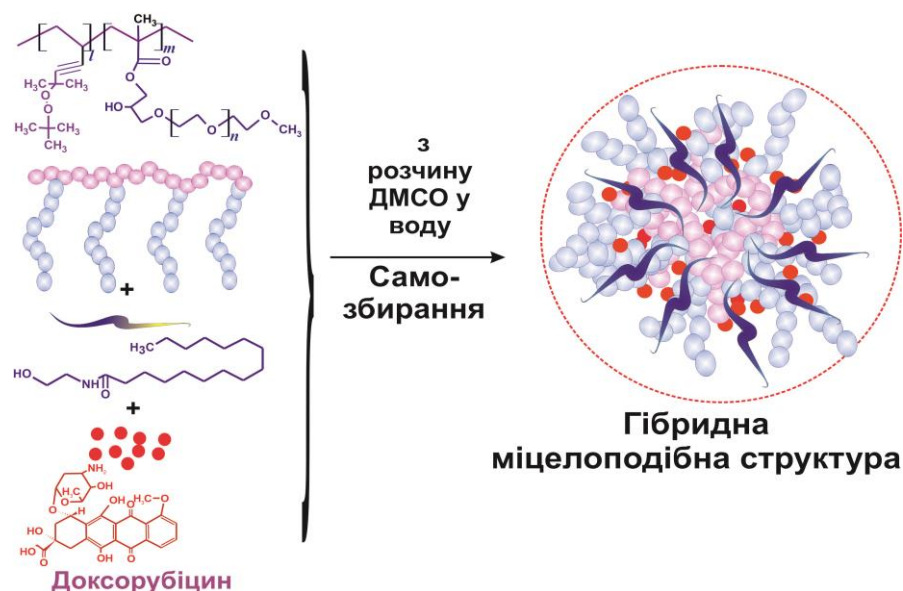


Рисунок 3. Загальна схема утворення комплексу з доксорубіцином у змішаних міцелах із PC + NSE

Дослідження вивільнення Dx із системи доставки лікарських засобів

Вивільнення Dx з міцелярних комплексів вивчали в модельному експерименті з фізіологічним розчином за допомогою набору Pur-A-Lyzer™ Maxi Dialysis Kit (Merck, Дармштадт, Німеччина). По 3 мл розчину чистого Dx або міцелярних комплексів Dx-PC і Dx-PC-NSE поміщали в діалізні пробірки Махі (розмір пор 3,5 кДа MWCO) і занурювали в 30 мл фізіологічного розчину (0,9% хлорид натрію). Всі колби інкубували при 37 °C при легкому перемішуванні, а зразки відбирали в

різні проміжки часу. Вивільнення Dх з міцелярних комплексів аналізували шляхом вимірювання УФ-спектрів діалізату при 220 нм на приладі Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) і будували графіки як функцію часу для визначення кінетики вивільнення препарату. Всі експерименти проводили щонайменше тричі з хорошою відтворюваністю.

2.1.2. Структура гребенеподібних амфіфільних полімерних носіїв із різними модифікаціями будови.

- 1) полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-мПЕГ;
- 2) полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-рEtOх;
- 3) полі(ПЕГМА-ко-ДММ), які включають одиниці полі(етиленгліколь)-метилефір-метакрилату (PEGMA) та диметилмалеїнату (DMM). Фізико-хімічні характеристики та спосіб отримання полімерів подано у Додатку 4.

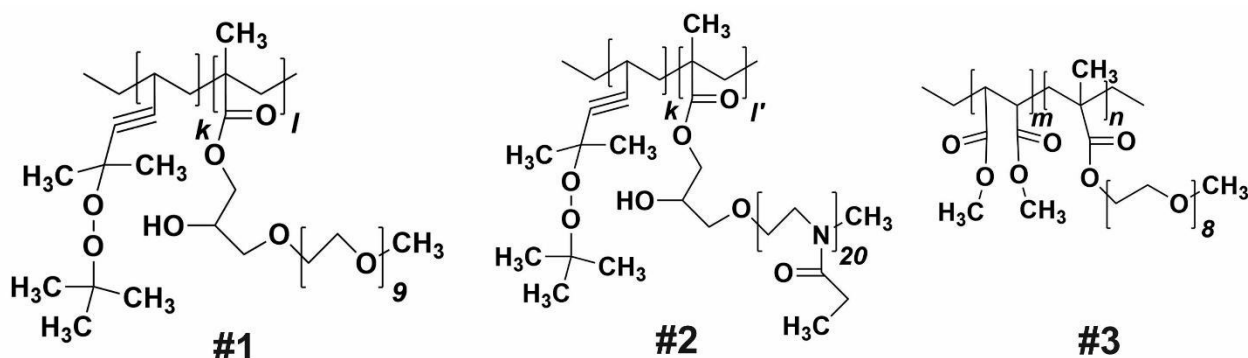


Рисунок 4. Структура ПК: #1-полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-мПЕГ ($k = 1,4\%$ мол., $l = 98,6\%$ мол., $M_n = 240$ кДа); 2-полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-рEtOх ($k = 1,0\%$ мол., $l' = 99,0\%$ мол., $M_n = 350$ кДа); 3-полі(ПЕГМА-ко-ДММ) ($k = 87,0\%$ мол., $l = 13,0\%$ мол., $M_n = 50$ кДа).

Таблиця 2. Склад, молекулярно-масові характеристики полімерних носіїв (ПН) та результати дослідження розмірів міцелоподібних структур за допомогою методу DLS.

Полі- мерний носій	Склад полімерних носіїв, % мол					Молеку- лярна маса полімерних кДа	Розмір міцелярних структур (метод DLS) (нм)
	<i>В</i> ЕП- ланки	<i>Г</i> МА- графт- мПЕГ- ланки	<i>ГМ</i> А- графт- пЕтОкс- ланки	<i>ПЕ</i> ГМА- ланки	<i>Д</i> ММ- ланки		
PC-mPEG	1,9	98	-	-	-	165	52.0±28.0
PC-pEtOx	1,0	-	99,0	-	-	350	180±33.0
PC-PEGMA	-	-	-	87,0	13,0	47.0	150 ±40

*-Для прищеплення використовували монометилловий ефір поліетиленгліколю (mPEG) з молекулярною масою 550 Да; ** - поліетилорсазолін (pEtOx) з молекулярною масою 2000 Да; *** для кополімеризації використовували мономер диметилмалеат (DMM) та макромер полі(етиленгліколь) метилловий ефір метакрилату (PEGM) з молекулярною масою 500 Да

2.1.3. Будова та отримання нанокомполітів на основі гребенеподібних полімерних носіїв та алкалоїдів.

Для приготування водних розчинів полімерних носіїв (ПН): 0,09 г ПН розчиняли 0,9 мл ДМСО. Цей розчин ПН додавали 8,0 мл 0,9% розчину NaCl. Потім розчин перемішували протягом 0,5 год і обробляли ультразвуком протягом 10 секунд. Для приготування водних систем доставки берберину (Verb) або алкіл-берберину (alcVerb) суміш сполук на основі Verb або alcVerb і ПН в розчині ДМСО додавали в фізіологічний розчин наступним чином: 0,045 г ПН розчинили в 0,15 мл ДМСО, а 0,0015 г Verb (або alcVerb). Розчини ПН та Verb (або alcVerb) змішали і додали до 4,25 мл 0,9% розчину NaCl і піддавали дії ультразвуку протягом 10 с. Наявність у структурі гребенеподібних-кополімерів карбоксанцієвих блоків обумовлює їхню поверхневу активність, здатність утворювати полімерні міцели з відносно високим числом агрегації, причому природа блоків помітно впливає на колоїдно-хімічні характеристики кополімерів. Утворення водних дисперсій

алкалоїдів відбувається в результаті їх нуклеації у воду, молекули гребенеподібних полімерних носіїв створюють оболонку, можна сказати, що гребенеподібні полімерні носії формують міцелярний «контейнер» із частинками алкалоїду в середині (рис.5).

Розмір полімерних міцел та полімерних комплексів з алкалоїдами вимірювали методом динамічного розсіювання світла (DLS) з використанням DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, Санта-Барбара, Каліфорнія, США). При утворенні міцелярних комплексів спостерігається збільшення розмірів колоїдних-структур (рис.6), що є характерним для систем доставки, які формуються в результаті нуклеації водонеразчинного лікарського препарату із розчину ДМСО у воду за присутності міцелоутворюючого полімерного носія.

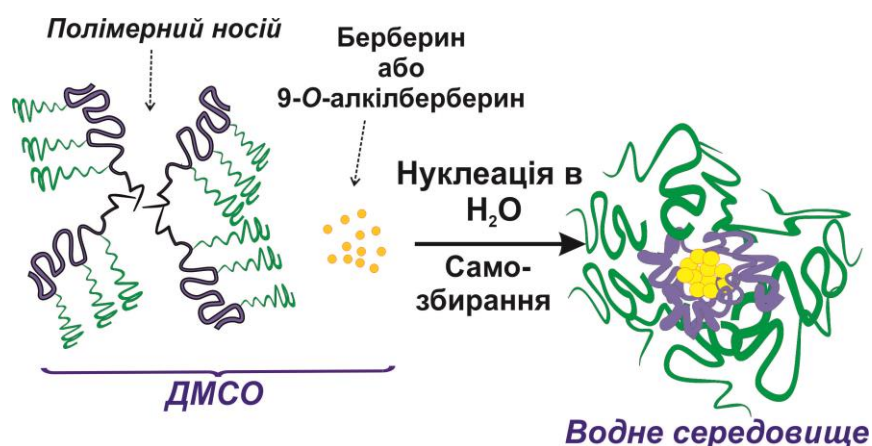


Рис 5. Схема формування водних систем доставки на основі гребенеподібних полімерних носіїв та алкалоїдів.

Розмір полімерних міцел та полімерних комплексів з алкалоїдами вимірювали за допомогою методу DLS з використанням DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, Санта-Барбара, Каліфорнія, США). При утворенні міцелярних комплексів спостерігали збільшення розмірів колоїдних-структур (Рис. 5), що є характерним для систем доставки, які формуються в результаті нуклеації водонеразчинної субстанції з розчину ДМСО у воду за присутності міцелоутворювального полімерного носія (Finiuk N, 2022; Kobylinska L, 2019).

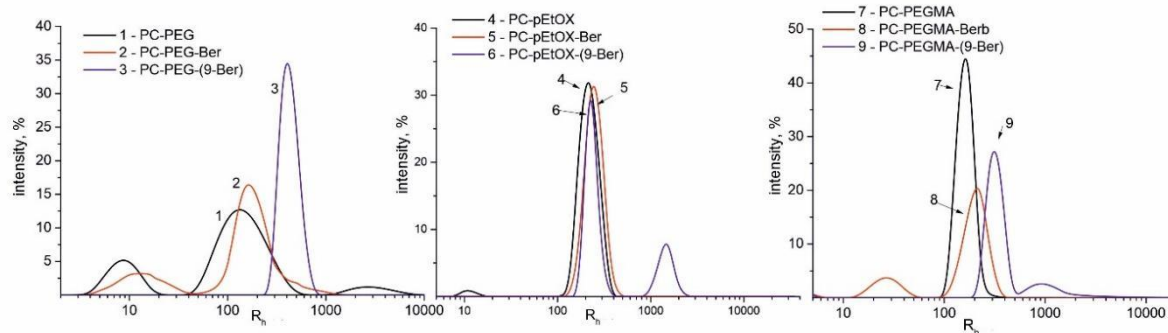


Рис. 6. Гідродинамічні радіуси міцелярних структур (1,4,7) утворюваних полімерними носіями та їх комплекси із Берберином(2,5,8) і 9-О-октил-берберин (3,6,9) ([полімер]=1г/100мл, [Алкалоїд]=0,03 г/100 мл)

2.1.4. Будова та синтез мінеральних наночастинок на основі оксиду заліза (ІІІ), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном)

Синтез та фізико-хімічні властивості та склад наночастинок, використаних у дослідженнях детально поданий у додатку 5.

Приготування наночастинок оксиду заліза, стабілізованих олеїною кислотою (ІО-ОА)

Наночастинки оксиду заліза (ІО) були отримані методом співосадження згідно з раніше опублікованим протоколом з невеликими модифікаціями (Świątek et al., 2019). Розчиняли $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,191 г) та $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,242 г) у 175 мл води після чого розчин нагрівали при 70°C протягом 10 хв. Двадцятип'ятивідсотковий розчин аміаку (10 мл) розбавляли до 35 мл і додавали по краплях до попереднього розчину до утворення чорних наночастинок ІО. Суміш нагрівали при 90°C протягом 1 год, охолоджували до кімнатної температури та обережно переносили в 3% розчин ОА/DCM (v/v). Отримані частинки ІО-ОА чотири рази промивали DCM (по 50 мл), повторно диспергували в DCM з ультразвуковою обробкою (UW 3100 sonicator; Bandelin Electronic; Берлін, Німеччина) протягом 5 хв при 30% амплітуді для досягнення концентрації 4 мг/мл і використовували для приготування mag.SLP. Для біологічних експериментів водну дисперсію частинок ІО-ОА готували шляхом

поступового переміщення частинок з DCM у воду за допомогою суміші етанол/вода за допомогою магнітної сепарації.

Приготування магнітних твердо-ліпідних частинок (mag.SLPs)

Mag.SLPs були підготовлені відповідно до попередньої процедури (Brezani^{ova} et al., 2016). Коротко, дисперсію TD (200 мг) і ІО-ОА (20 мг) у DCM (5 мл) змішували і DCM випарювали при 50°C. Розчин BL (50 мг) у DCM (2 мл) і воду (5 мл) нагрівали до 40°C і додавали в систему, суміш гомогенізували цифровим високошвидкісним гомогенізатором T25 Ultra-Turax (IKA; Staufen, Німеччина) при 12 000 об/хв протягом 10 хв, а потім знову гомогенізували ультразвуковим апаратом GM 2070 (Bandelin Electronic) шляхом безперервної дії ультразвуку протягом 6 хв (амплітуда 80%). Після гомогенізації композицію зберігали на крижаній бані щонайменше 30 хв, переносили в чистий флакон і доводили об'єм водою до 5 мл. Дисперсію зберігали в холодильнику при 4°C. Аналогічно готували немагнітні SLPs, але за відсутності ІО-ОА.

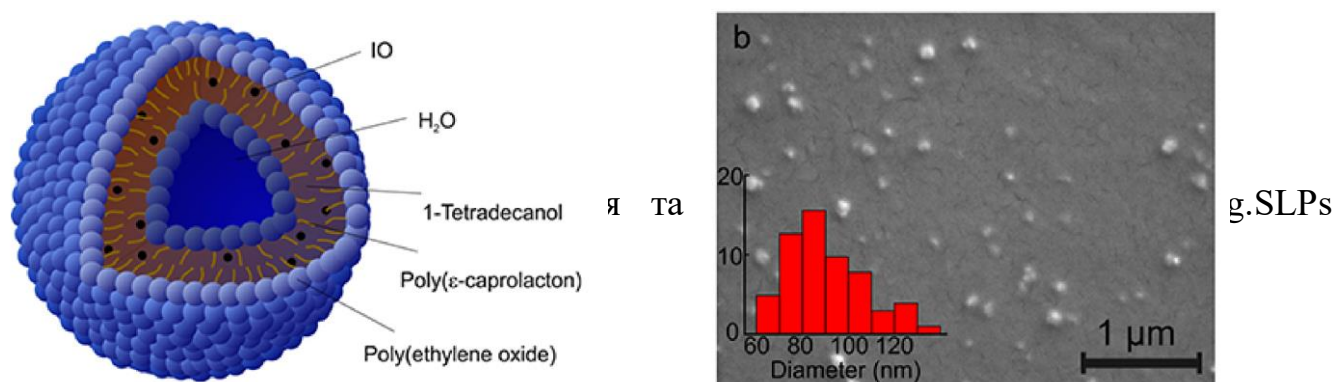


Рис.7. Схематичне зображення (А) та СЕМ-мікрофотографія mag.SLPs (В) (гранулометричний склад додається).

2.2. Біологічна частина

2.2.1. Матеріали

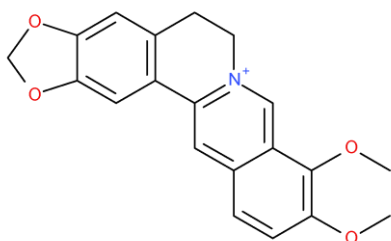
Доксорубіцин гідрохлорид було закуплено в компанії Pfizer (Нью-Йорк, США).

N-стеароїлетаноламін (NSE) синтезували у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна (Київ, Україна) за допомогою конденсації етаноламіну

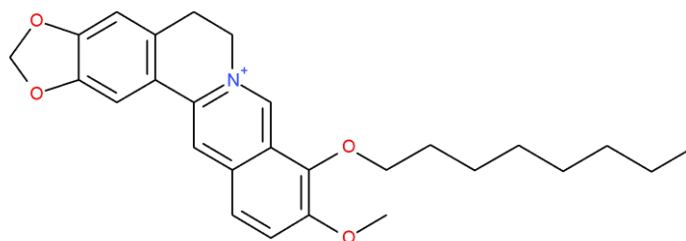
зі стеариноювою кислотою (Hudz I.A, 2022). Чистоту NSE підтверджували методом газової хроматографії (HRGC 5300, Carlo Erba Instruments, Val De Reuil, Франція) з використанням насадочної колонки Chromosorb W 100-125 (Supelco, Montclair, NJ, США) з фазою 10% Silar 5 CP. Температура інжектора та детектора становила 250 °C та 270 °C відповідно.

Висушений порошок NSE ресуспендували в етанолі для приготування 20 мМ вихідних розчинів. Серійні розведення NSE готували в культуральному середовищі *ex tempore* перед додаванням до клітинної культури.

Похідне 9-О-октил-берберину, синтезоване в рамках співпраці з колегами з Інституту біології Шандунської академії наук (м. Цзінань), містило 8 метиленових груп у ацильному ланцюзі.



Берберин



9-О-октил-берберин

2.2.2 Культивування клітин *in vitro*

У роботі використано панель злоякісних і псевдонормальних клітинних ліній людини та миші, перелічених у додатку 2, а також відповідне середовище для їх культивування.

Клітини культивували в середовищі DMEM (Merck, Дармштадт, Німеччина) або RPMI-1640 (Merck, Дармштадт, Німеччина) з додаванням 10% (v/v) термоінактивованої сироватки ембріонів великої рогатої худоби (FBS, Merck, Дармштадт, Німеччина) та 50 мкг/мл гентаміцину (Merck, Дармштадт, Німеччина) в зволоженій атмосфері, що містила 5% CO₂ при 37 °C. Клітини вирощували в CO₂-інкубаторі (Galaxy 170S, Eppendorf, Німеччина) і пересівали кожні 72 год з густиною 5×10^5 клітин на 1 мл живильного середовища для суспензійних культур і 5×10^4 клітин на 1 мл живильного середовища для субстрат-залежних культур.

Для морфологічної оцінки клітини перевіряли під інвертованим мікроскопом ІВ-100 (Delta Optical, Гданськ, Польща).

Всі клітинні лінії були отримані від професора Вальтера Бергера з Інституту дослідження раку Віденського медичного університету, Австрія, в рамках угоди про співпрацю з Інститутом біології клітини Національної академії наук України.

Клітини мишачої NK/Ly лімфоми були отримані з колекції експериментальних пухлин Інституту експериментальної онкології, патології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Національної академії наук України (Київ, Україна) та адаптовано для інокуляції в Інституті біології клітини НАН України д.б.н., проф. Луциком М.Д.

2.2.3. Методи оцінки цитотоксичної дії досліджуваних сполук

Оцінка життєздатності клітин буде проводитися з використанням методу виключення барвника трипанового синього (короткочасний (24 год) цитотоксичний ефект) та тесту МТТ (довготривалий цитотоксичний ефект сполук).

У дослідженні клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети (Greiner Bio One, Німеччина) у концентрації 100 000 клітин/мл (субстрат-залежні клітинні лінії) та у концентрації 500 тис/мл (суспензійні клітинні лінії) за присутності 10% сироватки ембріонів великої рогатої худоби та дії різних концентрацій досліджуваних речовин (див. рисунки). Після 24 год інкубації кількість клітин підраховували за допомогою гемоцитометричної камери, а кількість мертвих клітин визначали після фарбування 0,1% розчином трипанового синього. Цей барвник забарвлює мертві клітини з пошкодженими мембранами в синій колір, тоді як живі клітини залишаються незабарвленими.

Для оцінки віддалених цитотоксичних ефектів препаратів використовували колориметричний метод EZ4U Assay (Biomedica, Австрія), який базується на окисленні безбарвної форми барвника МТТ ферментами мітохондрій живих клітин до забарвленого субстрату - формазану. Клітини висівали в 96-лункові планшети (Sarstedt, Німеччина), через 24 год до них додавали досліджувані препарати в різних концентраціях, а через 72 год - реактив EZ4U (водорозчинна форма

тетразолієвого барвника), поміщали в термостат на 2 год й аналізували інтенсивність забарвлення зразків за допомогою мікропланшетного аналізатора BioTek ELx800 (Biotek Instruments, Inc., США) при довжині хвилі 405 нм.

Всі експерименти *in vitro* проводили в трьох незалежних серіях з двома повтореннями. Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програми GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., Сан-Дієго, Каліфорнія, США) з використанням одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA та тесту множинного порівняння Тьюкі або t-критерію Стюдента. Статистичну значущість встановлювали на рівні $p \leq 0,05$.

2.2.4. Визначення апоптозу

Для аналізу загибелі клітин їх фарбували APC-кон'югованим Annexin V та пропідію йодидом (PI) з використанням набору для виявлення апоптозу (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія, США) відповідно до інструкцій виробника, США). Після інкубації клітин з досліджуваними препаратами (24 год) клітини центрифугували при 1200 об/хв, двічі промивали забуференим фізіологічним розчином (PBS) та інкубували протягом 15 хв у буфері для зв'язування анексину V (BD Biosciences, Франклін-Лейкс, Нью-Джерсі, США), що містив 1/50 об'єму кон'югованого з APC розчину Анексину V та PI (50 мкг/мл). Опісля зразки розводили вдвічі відповідним об'ємом буфера для зв'язування анексину V (BD Pharmingen, США) і негайно проводили вимірювання, використовуючи фільтри 670/14 нм (APC) і 575/26 нм (PI) проточного цитофлуориметра BD LSR Fortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Cell Quest Pro (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) (Riccardi C, 2006).

2.2.5. Аналіз клітинного циклу

Вплив дії досліджуваних препаратів на розподіл клітин Т-лейкозу лінії Jurkat оцінювали згідно з протоколом, описаним Walker et al. та ін (Walker P.R, 1993). Після обробки препаратом відбирали 2×10^6 клітин, осаджували центрифугуванням

при 1000 об/хв за температури 4 °C протягом 5 хв, ресуспендували в 1 мл холодного PBS та фіксували шляхом поступового додавання 4 мл абсолютного етанолу при -20 °C. Наступного дня фіксовані клітини знову центрифугували, після чого клітинний осад ресуспендували в 1 мл PBS. Потім до суспензії додавали 100 мкл розчину РНКазу А (концентрація 200 мкг/мл, без домішок ДНКазу) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) та інкубували при 37 °C протягом 30 хв. Після цього до зразків додавали 100 мкл розчину йодиду пропідію (PI) (концентрація 1 мг/мл), інкубували при кімнатній температурі протягом 5–10 хв, а потім аналізували на проточному цитофлуориметрі FACScan (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Аналіз клітинного циклу проводили за допомогою програми Cytomation Summit Software v3.1 (Cytomation Inc., Fort Collins, CO, США).

2.2.6. Дослідження проникнення досліджуваних сполук у клітини-мішені

Вивчення часової та концентраційної динаміки проникнення нанокompatитних комплексів доксорубіцину у клітини-мішені проводили за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням суправітального барвника Hoechst 33342 (1 мкг/мл, Sigma, США) для візуалізації ультраструктури хроматину. Аналіз зразків здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, Німеччина) з використанням червоного фільтра (для детекції флуоресценції доксорубіцину) та синього фільтра (для детекції флуоресценції Hoechst 33342).

Для кількісного аналізу проникнення доксорубіцину в клітини-мішені застосовували метод проточної цитофлуориметрії, заснований на здатності препарату флуоресціювати при довжині хвилі 582 нм. Флуоресценцію доксорубіцину вимірювали на другому каналі (FL2) проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, США).

Аналіз проникнення нанокompatитних комплексів берберину та алкіл-берберину у злоякісні клітини визначали за допомогою FACS-аналізу, визначаючи їхню флуоресценцію при довжинах хвилі (450 нм, 530 нм, 576 нм), яка за даними літератури є маркером їхнього накопичення у клітинах-мішенях. Вимірювання проводили на проточному

цитофлуориметрі BD LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, США), канали Horizon 450 (450 нм) та FL1 (530 нм).

2.2.7. Оцінка продукції активних форм кисню (АФО) під впливом різних факторів

Для визначення вмісту різних активних форм кисню (АФО) у клітинах-мішенях під дією досліджуваних сполук використовували флуоресцентні барвники: дигідрохлорофлуоресцеїн діацетат (DCFDA), специфічний для гідроген пероксиду (H_2O_2), та дигідроетидій (DHE), специфічний для супероксид - аніон радикалів ($\text{O}_2^{\cdot -}$).

Для визначення рівня H_2O_2 клітини Т-лейкозу людини лінії Jurkat або клітин карциноми прямої кишки людини лінії HCT-116 (дослідження нанокомпозитів алкалоїдів) перед додаванням досліджуваних сполук піддавали пре-інкубації з DCFDA (10 мкМ) протягом 30 хв. Після завершення інкубації з препаратами флуоресценцію зразків визначали на фільтрі 530/30-А проточного цитометра BD LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, США).

Для визначення рівня $\text{O}_2^{\cdot -}$ клітини обробляли досліджуваними сполуками, а за 30 хвилин до завершення інкубації додавали DHE (10 мкМ). Після інкубації з DHE (30 хв) пробки охолоджували на льоді і негайно аналізували флуоресценцію на фільтрі 576/25-А проточного цитометра BD LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, США). У паралельному експерименті обов'язково аналізували аутофлуоресценцію зразків (без додавання барвника).

Подальший аналіз отриманих даних виконували за допомогою програмного забезпечення Cytomation Summit 3.1 (Cytomation, Inc, США).

2.2.8. Визначення вмісту тіолів в клітинах.

Для визначення вмісту тіолів в клітинах використовували флуоресцентний барвник монохлоробіман (mBCl). До клітин додавали 40 мМ mBCl (Merck, США), і за 30 хв після внесення барвника додавали досліджувані сполуки. Після цього клітини трипсинізували, двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином і

переносили у пробірки для проточного цитометра FACS Tubes (Becton Dickinson, США) та визначали флуоресценцію mBCl на askmnhs 450/50-A проточного цитометра BD LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, США). У паралельному експерименті обов'язково аналізували аутофлуоресценцію зразків (без додавання барвника).

2.2.9. Оцінка функціонального статусу мітохондрій злоякісних клітин за дії різних чинників.

Мембранний потенціал ($\Delta\Psi_m$) визначали за допомогою проточної цитометрії з використанням флуоресцентного барвника JC-1 (5,5'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензimidазолікарбоціанін йодид) (Sigma-Aldrich, США). За активного функціонування мітохондрій цей барвник утворює червоні агрегати, які локалізуються у цих органелах. При зниженні мембранного потенціалу барвник перебуває у мономерній формі та випромінює зелений флуоресцентний сигнал.

Клітини лінії Jurkat (Т-лейкоз людини, концентрація 1×10^6 клітин/мл) обробляли досліджуваними сполуками протягом 1, 3, 6, 12 та 24 годин. Після інкубації клітини промивали ЗФР і інкубували протягом 10 хв у розчині JC-1 (10 мг/мл) у безсироватковому середовищі при 37 °C.

Надлишок барвника видаляли шляхом промивки клітин у ЗФР, після чого флуоресценцію негайно вимірювали за допомогою проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, США) на першому (FL1) та другому (FL2) каналах.

Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення Cytomation Summit 3.1 (Cytomation, Inc, США).

2.2.10. Вестерн-блот-аналіз білків

2.2.10.1. Приготування лізатів клітин.

Після інкубації клітин із досліджуваними сполуками протягом різних часових інтервалів (1, 3, 6, 9, 12, 24 год) клітини осаджували шляхом центрифугування при 1000 об/хв протягом 5 хв. Після цього двічі промивали клітини за допомогою ЗФР. До отриманого осаду клітин додавали лізувальний буфер (20 mM Tris-HCl, pH 7,6,

1% Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,2% ДСН) та суміш інгібіторів протеаз (Complete™, Roche) із розрахунку 50 мкл буферу на 1 млн клітин. Лізування клітин проводили на льоді протягом 30 хв.

Отримані лізати центрифугували при 12000 g протягом 15 хвилин, після чого відбирали надосадову рідину. До надосадової рідини додавали 1/5 об'єму 5-кратного буферу Леммлі (10% ДСН, 10% 2-меркаптоетанол, 40% гліцерол, 0,01% бромфеноловий синій, 250 mM Tris-HCl, pH 6,8) і прогрівали у киплячій водянній лазні протягом 5 хв. Отримані зразки були готові для електрофоретичного аналізу та зберігалися при температурі -20 °C до подальшого використання.

2.2.10.2. Визначення концентрації білка

Концентрацію білка визначали за допомогою методу Петерсона (Peterson G.L, 1977). Аліквоти клітинних лізатів або білкових розчинів об'ємом від 5 до 100 мкл доводили дистильованою водою до загального об'єму 100 мкл. До кожного зразка додавали 0,1 мл 0,15% розчину дезоксихолату натрію, перемішували, а потім додавали 0,1 мл 72% розчину трихлороцтової кислоти. Після перемішування зразки центрифугували при 3000 g протягом 15 хв. Надосадову рідину усували, а до осаду додавали 1 мл реактиву А (у співвідношенні 1:1:1:1 — 0,1% CuSO₄, 0,2% Na₂K-виннокислового, 10% Na₂CO₃ : 0,8 M NaOH : 10% ДСН : дистильована вода). Після перемішування проби інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі.

Далі додавали 0,5 мл реактиву В (співвідношення 1:2 — 1 н розчин реактиву Фоліна : дистильована вода), перемішували й інкубували протягом 30 хв при 37 °C. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі ThermoSpectronic (Helios, Велика Британія) при довжині хвилі 750 нм.

Концентрацію білка розраховували за калібрувальною кривою, побудованою на основі значень оптичної густину для стандартних розчинів бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

2.2.10.3. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі за методом Леммлі

Білки розділяли методом вертикального електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) за денатуруючих умов, відповідно до протоколу Леммлі (Laemmli UK, 1970). Концентрація поліакриламіду в концентрувальному гелі становила 4%, а в розділювальному гелі — 12%. У лунки гелю вносили аліквоти, що містили 30 мкг білка.

Електрофорез проводили в Tris-гліциновому буфері (pH 8,3; 25 mM Tris, 192 mM гліцин, 0,1% додецилсульфат натрію) за струму 0,03 А на дві пластинки гелю. Тривалість аналізу становила 3–4 год. Для проведення електрофорезу використовували камеру Mini-PROTEAN II (BioRad, Швеція).

Молекулярну масу білків визначали за допомогою стандартних калібрувальних білків (Fermentas, Литва).

2.2.10.4. Імуноблот-аналіз білків

Вестерн-блот-аналіз використовували для оцінки експресії білків, що беруть участь у сигнальних шляхах відповідних клітинних ліній (Jurkat, НСТ 116 wt) після обробки досліджуванними нанорозмірними комплексами в різні часові інтервали (3, 6, 9, 12 год). Клітини двічі промивали на льоді PBS перед додаванням буфера для лізису (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1% трасилол, 1 mM PMSF), 20 мкл на 10⁶ клітин, вортексували та центрифугували. Концентрацію білка в супернатантах вимірювали, як описано (Peterson, G.L., 1977). Потім додавали відповідний об'єм 5 × буфера Леммлі (10% SDS, 10% 2-меркаптоетанол, 40% гліцерол, 0,01% бромфенолсиній, 250 mM трис-HCl, pH 6,8), зразки прогрівали протягом 5 хв у киплячій воді і піддавали Вестерн-блот-аналізу. Кількість 30 мкг білка з кожного зразка клітин наносили на 12% поліакриламідні гелі. Після електрофорезу (4 год за напруги 0,02 А) білки переносили на нітроцелюлозні мембрани (GE Healthcare Bio-Sciences, Marlborough, MA, США) за допомогою Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) при 90 В протягом 1,5 год. Для блокування неспецифічного зв'язування мембран використовували інкубацію

мембран у 5% знежиреному молочному розчині протягом 1 год при 37 °C. Мембрану інкубували з моноклональними кролячими антитілами, отриманими проти розщепленої каспази-3, прокаспаз-6, розщепленої каспази-6, розщепленої каспази-7, Bid (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, США), AIF (sc-5586), Bcl-XL/S (sc-634) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), каспаза-9 (BD 556585) (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія, США), β -актину (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, США) та моноклональні мишачі антитіла проти PARP-1 (BD 556434), FADD (BD 556402), Mcl-1 (BD 559027), каспази-2 (BD 611022), каспази-8 (BD 551242) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), каспази-10 (M059-3) (MBL International Corporation, Woburn, MA) протягом 12 год при 4 °C з повільним струшуванням. Розведення для первинних антитіл становило 1:1000 у 5% BSA, 0,1% PBS-Tween, за винятком антитіл проти β -актину (1:5000), як рекомендовано постачальником. Після інкубації з первинними антитілами мембрану тричі промивали протягом 5 хв у PBS з 0,1% Tween 20, а потім інкубували у розведенні 1:5000 вторинних анти-кролячих IgG до пероксидази хрому, зв'язаних з пероксидазою (GE Healthcare Bio-Sciences, Marlborough, MA, США) протягом 1 год при кімнатній температурі.

Мембрану промивали 3 рази PBS-Tween 20 протягом 5 хв, і білки, які зв'язані з антитілами, візуалізували шляхом інкубації мембрани протягом 1 хв у буфері ECL (1,25 мМ люмінол (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2,72 мМ кумарової кислоти (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) і 0,01% H_2O_2 в 0,1 М трис-HCl (pH 8,5), та експонування протягом 10-15 хв на рентгенівську плівку (Fujifilm, Токіо, Японія). Відносну кількість білка в електрофоретичних смугах визначали кількісно за допомогою програмного забезпечення ImageJ Analysis (www.imagej.net, доступ 30 листопада 2022 р.). Нормалізацію білка проводили за рівнем β -актину в тих самих зразках.

2.2.11. Дослідження *in vivo*

2.2.11.1. Умови утримання тварин.

У роботі використовували самців мишей ліній Balb/c, C57black/6, DBA/2 та BDF1 (гібрид Balb/c × DBA/2), розведених в Інституті біології клітини НАН України та утримуваних у віварії Інституту клітинної біології клітин НАН України за умов контрольованого температурного режиму з 12-годинним світловим/темновим циклом, за стандартного харчового раціону для гризунів (ТОВ «Віта», м. Обухів, Україна) та води *ad libitum*. Мишей щоденно обстежували з метою контролю стану здоров'я та поведінкових показників.

Усі дослідження на тваринах проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) та відповідним Законом України (№ 944 від 14.12.2009). Процедури всіх досліджень *in vivo* отримали етичне схвалення Комітету з питань біоетики Інституту біології клітин НАН України (протокол № 9/2014 від 1.09.2014); (протокол N9/2023 від 1.09.2023); (протокол N2/2024 від 19.03.2024); (протокол №9/2023 від 1.09.2023 р.-дослідження біосумісності полімерних носіїв); (протокол №2/2023 від 26.09.2023 р. Дослідження терапевтичної дії нанокompозитів алкалоїдів щодо мишачої меланоми B16/F10).

2.2.11.2. Дослідження гострої токсичності сполук

Гостру токсичність досліджуваних у роботі наноматеріалів вивчали на мишах лінії C57black/6 та Balb/c за умови доочеревинного введення згідно з методичними рекомендаціями (Стефанов ОВ, 2001).

Протягом експериментів по токсичності наноматеріалів фіксували наступні показники: морфо-функціональний стан організму піддослідних тварин - масу тіла, тривалість життя. Після останньої отриманої дози досліджуваних зразків, проводили забір крові для визначення гематологічних та біохімічних показників.

Для гематологічного аналізу, зразки крові (100 мкл) відбирали шляхом ретроорбітальної кровотечі в пробірки, що містили 10 мкл 10% розчину натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (розчин Na₂-EDTA) як антикоагулянту. Гематологічний профіль у обстежених мишей, включаючи підрахунок рівня

гемоглобіну, еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, відносного вмісту нейтрофілів (%), лімфоцитів (%) і моноцитів (%), вивчали за допомогою 5-секційного автоматичного гематологічного аналізатора DF51Vet (DYMIND Biotechnology Co., Ltd., Шеньчжень, Китай) відповідно до інструкцій виробника.

Для біохімічного аналізу, сироватки крові забирали шляхом ретроорбітальної кровотечі в пробірки без антикоагулянту, сироватку відокремлювали центрифугуванням при $190 \times g$ протягом 10 хв при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ і зберігали в морозильній камері при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до використання. Вимірювання активності аспартатамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ) та лужної фосфатази (ЛФ), а також концентрації креатиніну та сечовини проводили на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS-3000M (SINNOWA Medical Science & Technology Co., Ltd., Nanjing, Китай) з використанням діагностичних наборів фірми Cormay S.A. (Лом'янки, Польща). Усі вимірювання проводили відповідно до інструкцій виробника.

2.2.11.3. Дослідження терапевтичної дії протипухлинних препаратів у складі нанокомплексів на моделях лімфоми NK/Ly, лейкозу L1210 і меланоми B16F10 дикого типу.

У роботі використано мишачі моделі пухлин, а під час еспериментів з терапії проводили визначення показників пухлинного росту (тривалість життя піддослідних тварин та зміни розмірів їхніх пухлин) (Workman P, 2010).

Штам лімфоми NK/Ly отримано з колекції експериментальних пухлин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України та адаптовано для інокуляції д.б.н., проф. М.Д. Луциком. Підтримку лімфоми NK/Ly здійснювали шляхом доочеревинного перещеплення асцитної рідини (1 млн клітин у 0,5 мл фіз.розчину) на 7-8 день росту лімфоми від тварини-пухлиноносія до тварини-реципієнта лінії Balb/c (Западнюк ІП, 1983).

Штами клітин лейкозу L1210 та меланоми B16F10 були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня (Австрія) в рамках співпраці з науковою групою проф. В. Бергера. Лейкоз L1210

пасажували на мишах лінії BDF₁ шляхом ін'єкції 1×10^5 пухлинних клітин, відібраних з тварини-донора на 6-7 день розвитку пухлини та промитих PBS (Geran RI, 1972).

Інокуляцію меланоми B16F10 здійснювали шляхом підшкірного введення мишам лінії C57BL/6 суспензії пухлинних клітин, розведеної в розчині Хенкса, у кількості 1×10^6 клітин на одну тварину у правий фланг задньої лапки. Досліджувані речовини вводили внутрішньочеревно, починаючи з 10-го дня після інокуляції пухлини при підтвердженні наявності росту пухлини у місці прививання. Довжину, ширину і висоту пухлини вимірювали кожних три дні за допомогою штангенциркуля. Об'єм пухлини обчислювали за формулою (Tomayko MM, 1989) :

$$V(\text{об'єм}) = \frac{L(\text{ширина}) * L(\text{довжина}) * L(\text{висота})}{2} (\text{мм}^3)$$

Контроль (без введення речовин) і дослід вели одночасно.

Схеми хіміотерапії подано у результатах досліджень.

Аналіз виживання тварин (криві Каплана-Майєра) проводили за програмою GraphPad Prism 5.

2.2.12. Статистична обробка отриманих результатів дослідження

Всі експерименти були виконані у трьох паралельних повтореннях для кожного варіанта. Кожна точка на графіках і значення ординати стовпців на діаграмах відповідають середньому значенню M, розрахованому за результатами трьох вимірювань. Стандартну похибку «m» визначали на основі середнього квадратичного відхилення «σ».

Дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Prism 8.4.3 (GraphPad; Бостон, штат Массачусетс, США) і виражені як середнє значення \pm стандартна похибка середнього. Порівняння відмінностей між групами проводили за допомогою одностороннього ANOVA-тесту. Значущість різниці позначено зірочками: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ та **** $p < 0,0001$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Посилення селективності протипухлинної дії доксорубіцину шляхом його ко-імобілізації з NSE на полімерному носії

Dx залишається одним із найпоширеніших протипухлинних препаратів для лікування раку різних типів і тканинного походження (Minotti G, 2004). Однак його застосування в клінічній практиці обмежене через кумулятивну кардіотоксичність, яка переважно зумовлена надмірною продукцією супероксидних аніон-радикалів у кардіоміоцитах (McGowan JV, 2017), а також швидким розвитком транспортер-опосередкованої резистентності до ABC у пухлинних клітинах (Broxterman HJ, 2009). Для подолання цих обмежень, для Dx використовують два основні підходи - хімічну модифікацію молекули та наноносії для його доставки в організм. У рамках першого підходу було синтезовано його стереоізомер - епірубіцин, який характеризується в 10 разів довшим періодом напіввиведення та збільшеним об'ємом розподілу. Крім того, було показано, що елімінація 4-метоксигрупи в кільці D призводить до значного збільшення ліпофільності ідарубіцину, тим самим посилюючи його поглинання клітинами-мішенями (McGuirk S, 2021). Однак ці хімічні модифікації антрациклінів призводили переважно до підвищення їх цитотоксичної активності, з помірним впливом на їх несприятливий вплив на організм онкологічних хворих (Khasraw M, 2012, Owattanapanich W, 2018). Навпаки, наноформи Dx на основі ліпосом, такі як Doxil® (~100 нм, ПЕГ-функціоналізований) або Myocet® (ліпосомний неPEGільований Dx), проявляли значне зменшення побічних ефектів порівняно з оригінальним Dx, але при цьому не спостерігалось виразного підвищення його терапевтичної ефективності (Lao J, 2013).

Саме тому розробка вдосконаленої системи доставки доксорубіцину, здатної одночасно підвищити його терапевтичну активність і знизити побічні ефекти, залишається важливим завданням у хіміотерапії раку.

У попередніх дослідженнях ми встановили, що використання синтетичних гребенеподібних ПЕГілованих полімерів, підвищує терапевтичну активність доксорубіцину, дозволяючи зменшити терапевтичну дозу в експериментах. Водночас ці полімерні комплекси доксорубіцину не впливають на несприятливі побічні ефекти *in vivo* (SenkivY, 2014). Тут ми запропонували поєднати обидві вищезгадані стратегії - одночасне посилення ліпофільності та збільшення біорозподілу доксорубіцину шляхом його коїммобілізації на полімерному носії, кон'югованому з синтетичним канабіміметиком NSE, що володіє природною протизапальною та антиоксидантною активністю.

3.1.1. Цитотоксична та цитопротекторна дія NSE щодо злоякісних та псевдонормальних клітин людини *in vitro*

N-стеароїлетаноламін належить до класу сполук ендоканабіноїдів, зокрема до групи N-ацилетаноламінів (NAE) – біоактивних ліпідів, відомих своїми протизапальними, антиоксидантними, імуномодуючими властивостями. N-ацилетаноламіни (NAE) проявляють широкий спектр біологічної активності, зокрема є потужними кардіо- та нейропротекторами, що робить їх перспективними агентами для використання у клінічній медицині.

Серед таких речовин є такі, які проявляють протипухлинну активність щодо злоякісних клітин різного генезу (Pisanti S, 2013). Зокрема, анандамід має виражений антипроліферативний ефект щодо клітин раку молочної залози людини, блокуючи їх перехід з S-фази клітинного циклу. Згідно попередніми дослідженнями, N-стеароїлетаноламін володіє протипухлинною активністю *in vivo* на моделі карциноми легень Льюїса у мишей (Hula NM, 2006), однак молекулярні механізми цього явища досі нез'ясовані.

Ми дослідили цитотоксичну активність, а також потенційні молекулярні механізми дії двох представників цієї родини – N-пальмітоїлетаноламіну (NPE) та N-стеароїлетаноламіну (NSE), які відрізняються за довжиною ацильного залишку – 16 та 18 метиленових груп відповідно, на злоякісні та псевдонормальні клітини

in vitro у різні часові проміжки (24 год і 72 год). Результати оцінки цитотоксичної дії широкого діапазону концентрацій NSE та NPE наведено на Рис. 8.

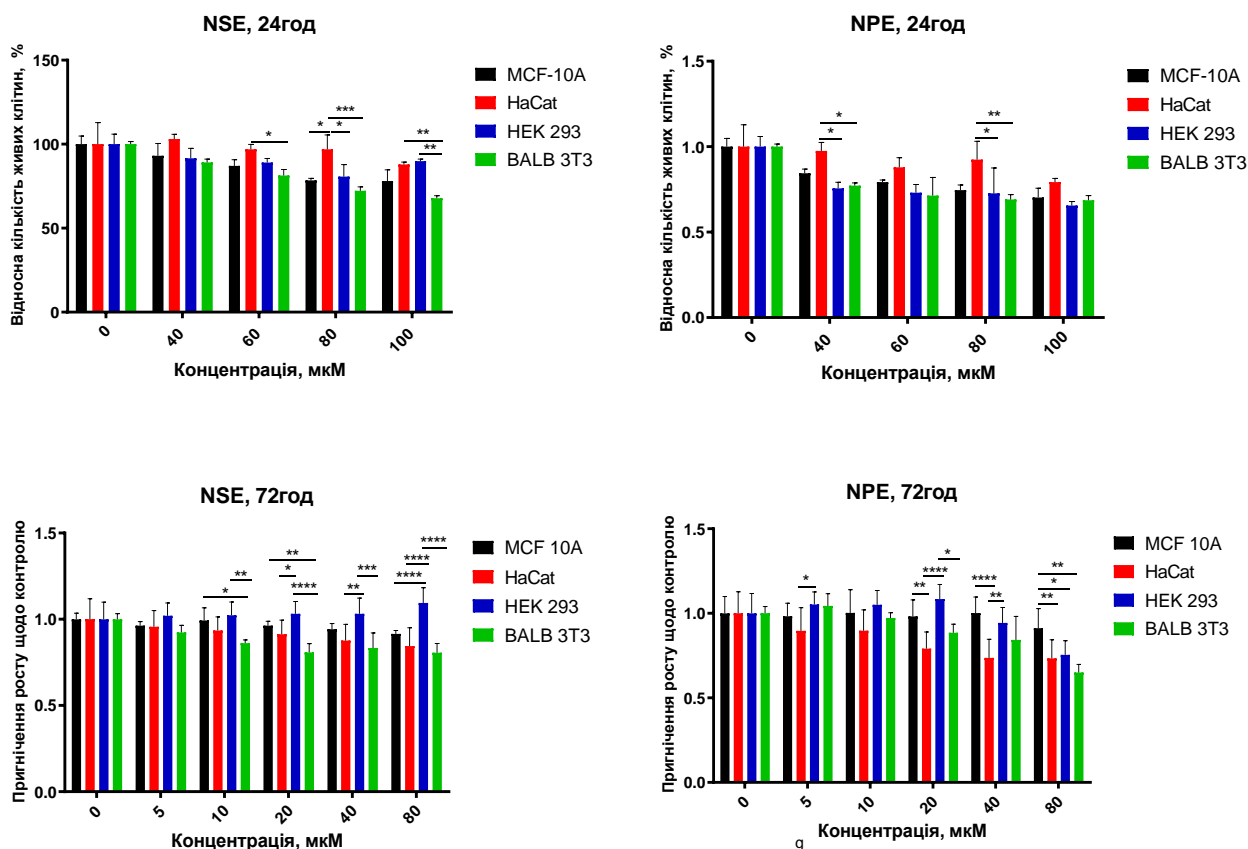


Рис. 8. Порівняння короточасної (24 год) та довготривалої (72 год) цитотоксичної активності NSE та NPE щодо епітеліальних клітин молочної залози людини лінії MCF-10A, кератиноцитів людини лінії HaCat, ембріональних клітин нирки людини клітин ембріональних нирок людини лінії HEK 293 та ембріональних клітин мишей лінії Balb 3T3. Тест виключення трипанового синього, 24 год. Інкубація. МТТ-тест, 72 год інкубація (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Для оцінки антипроліферативної активності зазначених N-ацилетаноламінів були використано наступні псевдонормальні клітинні лінії: епітеліальні клітини молочної залози людини (MCF-10A), кератиноцити (HaCat), ембріональні клітини нирки людини (HEK293) та ембріональні клітини миші (Balb 3T3). Виявлено, що обидві сполуки навіть у максимально досліджених концентраціях (80 мкМ, що

еквівалентно дозі ~24 мкг/мл NPE та ~26 мкг/мл NSE) не змогли вбити вищезгадані клітинні лінії. Максимальне зниження життєздатності клітин становило менше 25% для 100 мкМ концентрації обох сполук через 24 год дії навіть для найчутливіших клітин - Balb 3T3 (Рис. 8). Отримані дані свідчать про низьку токсичність обох сполук щодо псевдонормальних клітинних ліній. Отримані результати є важливими, оскільки вони демонструють низький рівень неспецифічної токсичності NSE та NPE щодо псевдонормальних клітин. Це є ключовим фактором для оцінки їхнього потенційного застосування у подальших дослідженнях. Отримані дані щодо цитотоксичної активності двох представників N-ацилетаноламінів стали основою для розробки комплексу NSE з біосумісним природним полімером хітозаном у формі гідрогелю. Ці дослідження мали важливе значення для створення та доклінічного випробування нового вітчизняного препарату, здатного стимулювати загоєння ран та пригнічувати запальні процеси в експериментальних моделях на лабораторних тваринах. Цей засіб є важливим для травматології та має актуальне значення для військової медицини (Manko N, 2024).

Виявлено, що NSE мав слабку дозозалежну протиракову дію на клітини Jurkat, L1210, MDA-MB-231 та MCF-7 після 24-годинної обробки із загальною LC50 близько 50 мкМ (Рис. 10). Нами виявлено, що NSE володіє слабо вираженим антинеопластичним ефектом *in vitro* щодо клітин лінії Jurkat Т-лейкозу людини на 24-ту годину. Однією з причин цього явища може бути вбудовування NSE в плазматичну мембрану клітин-мішеней, що порушує її структуру. Для підтвердження цього ми провели цитоморфологічне дослідження клітин Т-лейкозу людини лінії Jurkat, яке показало суттєве збільшення їх розмірів після введення високих концентрацій N-стеароїлетаноламіну (30 мкМ) протягом 24 год порівняно з нелікованим контролем (Рис. 9).

Потенційна токсичність NAE для клітин раку молочної залози в залежності від ступеня їх чутливості до естрогенів заслуговує на особливу увагу, бо існуючі дані про дію цих канабіноїдоподібних сполук є фрагментарними і недостатніми (Pisanti, S., 2013). Встановлено, що NSE проявляє приблизно на 30% вищу активність щодо естроген-резистентних клітин MDA-MD-231 (LC50 = 30 мкМ), ніж щодо естроген-

чутливих клітин MCF-7 ($LC_{50} = 50 \text{ мкМ}$) (Рис. 10). Отже, естроген-резистентні клітини раку молочної залози людини лінії MDA-MB-231 виявилися в 1,5 раза чутливішими до дії N-стеароїлетаноламіну, ніж естроген-чутливі клітини лінії MCF-7. У той же час, N-пальмітоїлетаноламін, який відрізняється від NSE лише довжиною бічного ланцюга, який у NPE є коротшим на 2 метиленові фрагменти, не проявляв настільки вираженої різниці у дії на естроген-чутливі та естроген-резистентні клітини (Рис. 10). Це вказує на важливу роль залишка жирної кислоти у молекулі N-ацилетаноламінів у реалізації вибіркової дії цих біологічно активних ліпідів на злоякісні клітини, стійких до дії естрогенів.

Отримані результати вказують на перспективність застосування NSE в комбінованій терапії естроген-резистентних пухлин.

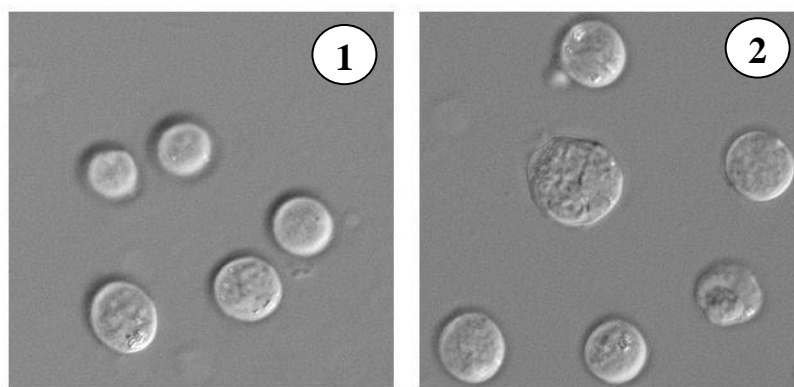


Рис. 9. Оцінка цитостатичних властивостей NSE *in vitro*. Збільшення діаметра клітин Т-лімфоцитів лінії Jurkat людини після обробки протягом 24 годин N-стеароїлетаноламіном (30 мкМ). Світлова мікроскопія, $\times 40$. 1 - контроль, 2 - NSE.

Нами було встановлено селективність дії цих канабіноїдів на злоякісні клітини порівняно з псевдонормальними (Рис. 8). Наші дані демонструють, що псевдонормальні клітинні лінії щонайменше в 2 рази стійкіші до дії NSE та NPE порівняно з пухлинними клітинами того ж походження.

Можливою причиною такої активності NSE може бути його вбудовування в плазматичну мембрану оброблених клітин, що впливає на структуру мембрани. Ця гіпотеза підтверджується статистично значущим збільшенням розміру оброблених клітин Jurkat після впливу високих концентрацій (30 мкМ) NSE, а також зупинкою

клітинного циклу у фазі G1 клітинного циклу, що було продемонстровано за допомогою FACS-аналізу (Рис. 11). Однак у цих дослідженнях не було виявлено жодних ознак апоптичних (до G1) клітин, незважаючи на статистично значуще зменшення кількості клітин Jurkat за обробки високими дозами NSE (Рис. 12). Для підтвердження цього висновку було досліджено екстерналізацію фосфатидилсерину за допомогою FACS з використанням тесту з Annexin V через 48 годин інкубації клітин Jurkat з різними дозами NSE. Виявлено, що NSE дозозалежно знижував кількість Annexin V(+) (апоптичних) клітин порівняно з контролем, яка досягала найнижчого значення за обробки найвищою (50 мкМ) дозою NSE (Рис. 12).

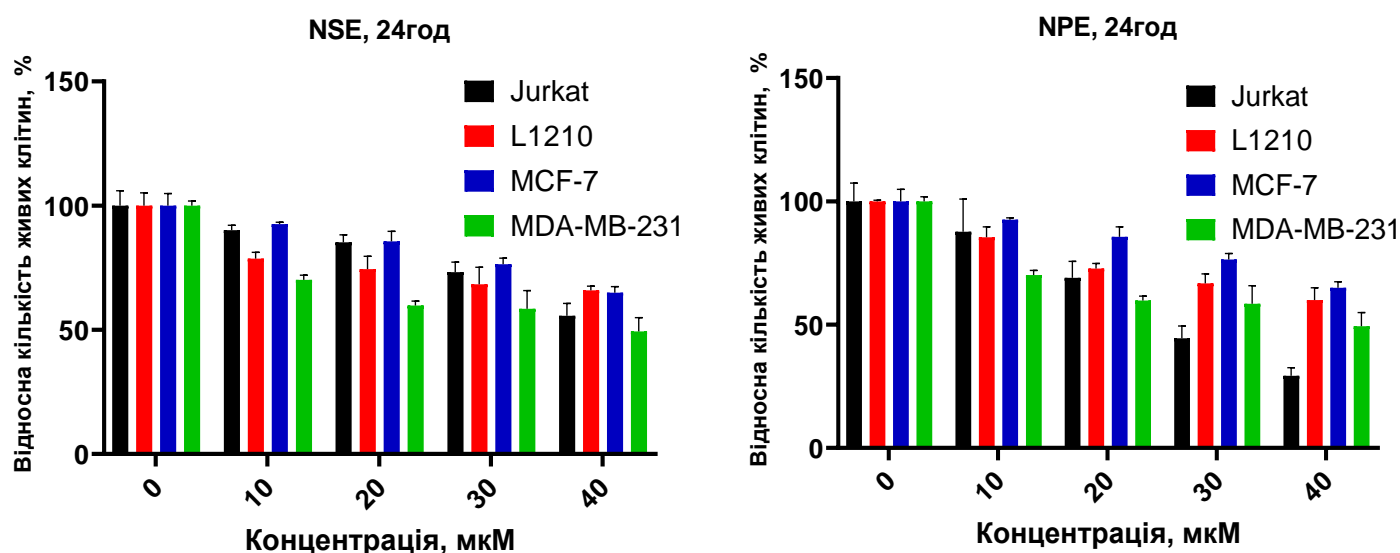


Рис. 10. Оцінка цитостатичної та цитотоксичної активності NSE та NPE *in vitro*. Забарвлення трипановим синім клітин лінії Jurkat Т-лімфоцитів людини, клітин лейкозу миші L1210, клітин ліній MCF-7, MDA-MB-231 аденокарциноми молочної залози людини з різними концентраціями NSE, інкубація 24 год (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

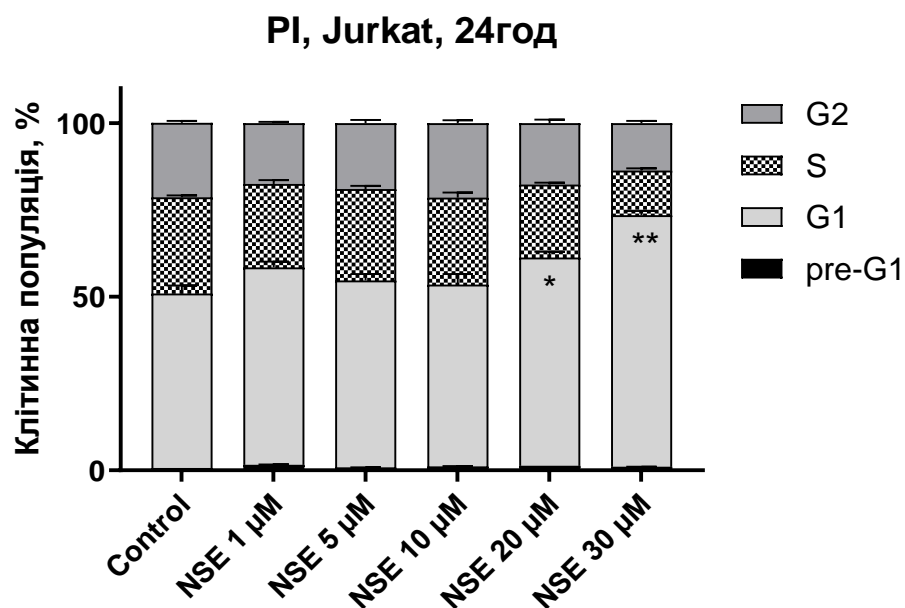


Рис. 11. Зміни клітинного циклу в клітинах лінії Jurkat Т-лейкозу людини під впливом різних концентрацій NSE досліджено за допомогою проточної цитофлуориметрії із забарвленням PI (24 год інкубації) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

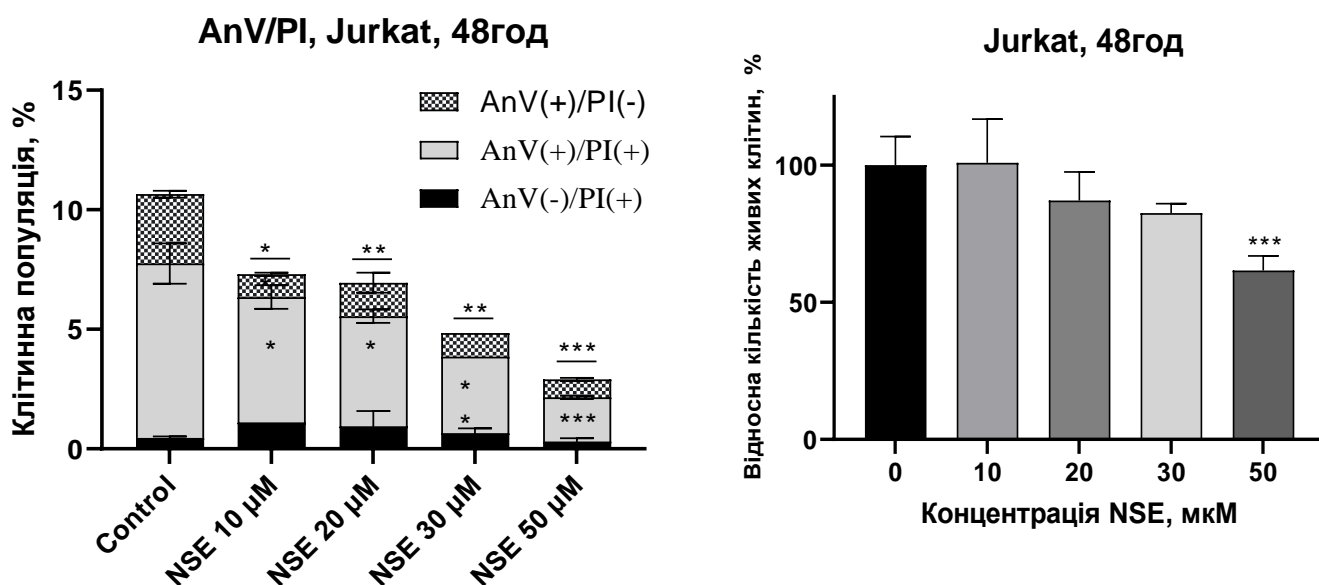


Рис. 12. Вплив NSE на індукцію апоптозу та життєздатність Т-клітин лінії Jurkat оцінювали після 48 год інкубації за допомогою методу проточної цитофлуориметрії з використанням подвійного забарвлення Annexin V/PI, а також тесту на виключення трипанового синього.

У той же час, за даними тесту з трипановим синім, NSE (50 мкМ) призводив до зменшення кількості клітин Jurkat на 40% порівняно з контролем (рис. 12). Таким чином, наші дані вказують на цитостатичну дію NSE *in vitro*, який пригнічує ріст пухлинних клітин, але не призводить до їх загибелі. Це в свою чергу, опосередковано підтверджує гіпотезу про вбудовування цього ліпиду в плазматичну мембрану пухлинних клітин.

Таким чином, використані біологічно активні ліпіди можуть слугувати основою для подальших досліджень, використаних на оцінку їхньої специфічності та перспективності використання як терапевтичних засобів.

Раніше було показано, що N-стеароїлетаноламін має цитопротекторну і антиоксидантну дію *in vivo* (Gulaya NM, 1998, Hula N, 2009). Проте механізми цих ефектів залишаються недостатньо вивченими. У цій роботі ми дослідили вплив цієї канабіноїдоподібної сполуки на рівень двох основних типів АФО – гідроген пероксиду та супероксидного аніон-радикалу - у Т-клітинах лінії Jurkat. Для цього було застосовано метод проточної цитофлуориметрії з використанням специфічних флуоресцентних барвників - DCFDA для визначення гідроген пероксиду та DHE для супероксид-аніон-радикалу. Виявлено, що NSE не впливав на рівні обох типів АФО у клітинах Jurkat на ранніх часових інтервалах (1, 3, 6, 12 год). Однак через 24 год інкубації мало місце зниження базального рівня супероксидного аніон-радикалу на 20-25% (Рис. 13). Аналогічну, але менш виражену тенденцію спостерігали щодо зниження продукції гідроген пероксиду під впливом NSE (Рис. 13).

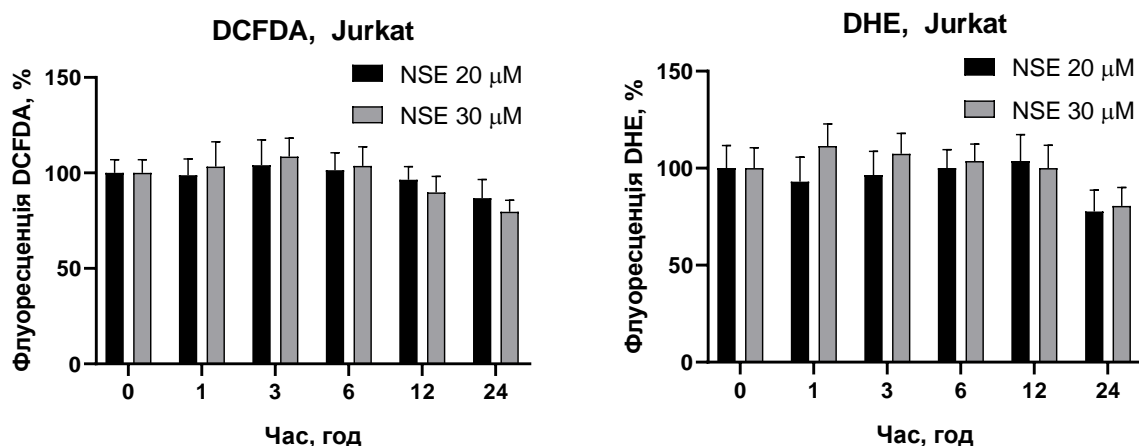


Рис. 13. Часозалежні зміни продукції H_2O_2 та $\text{O}_2^{\cdot-}$ у Т-клітинах лінії Jurkat за обробки різними концентраціями NSE, проточна цитофлуориметрія, забарвлення DCFDA та DHE, відповідно. Вплив NSE на ріст клітин та продукцію активних форм оксигену (АФО) порівнювали з контролем (без обробки). Дані подано у вигляді середнього значення \pm SD трьох незалежних експериментів, виконаних у триразовій повторності. Статистичну достовірність у порівнянні з контролем і між дослідними групами оцінювали за допомогою одновимірного дисперсійного аналізу (ANOVA) і тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.1.2. Цитопротекторна та антиоксидантна активність N-стеароїлетаноламіну у комбінації з доксорубіцином: вплив на злоякісні клітини людини *in vitro*.

Для перевірки здатності N-стеароїлетаноламіну впливати на цитотоксичну активність доксорубіцину *in vitro* було проведено дослідження комбінованої дії NSE та протипухлинного антибіотика доксорубіцину на Т-клітини лінії Jurkat. Ми не виявили цитопротекторного ефекту NSE у всьому діапазоні концентрацій щодо протипухлинної активності високих доз Dx (0,5 мкМ, 24 год). Однак при застосуванні нижчих концентрацій Dx (0,25 мкМ, 24 год, 0,05 мкМ, 48 год) і високими дозами NSE (20 мкМ) такі ефекти спостерігалися.

Таким чином, NSE виявив виражену цитопротекторну активність у поєднанні з низькими дозами протипухлинних препаратів.

Для підтвердження отриманих даних, було використано метод подвійного забарвлення Annexin V/PI. Виявлено, що сумісна обробка Т-клітин Jurkat з NSE у високих концентраціях (30 мкМ і 50 мкМ) і низьких концентрацій Dх (0,01 і 0,05 мкМ, відповідно) призводила до глибокого зниження кількості апоптичних клітин на 48 год інкубації. Однак, за обробки клітин високими концентраціями Dх (0,25 мкМ та 0,5 мкМ) антиапоптичного ефекту NSE не спостерігали (Рис. 14, 15 А).

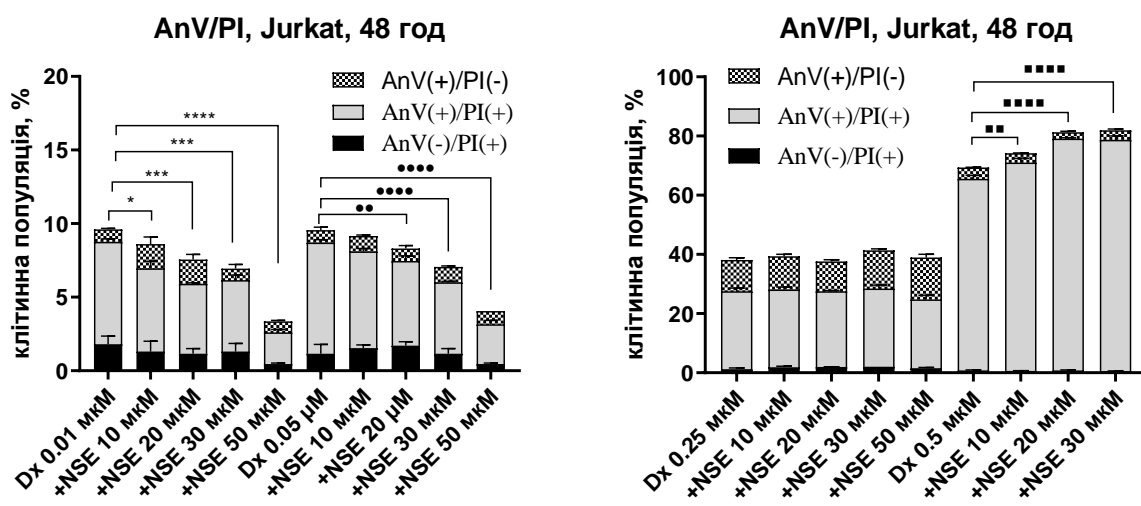


Рис. 14. Екстерналізація фосфатидилсерину в клітинах Jurkat після обробки різними концентраціями доксорубіцину та N-стеароїлетаноламіну протягом 48 год. Проточна цитофлуориметрія, APC-анексин V та подвійне забарвлення PI. Достовірність порівняно з контролем та іншими групами розраховували за допомогою одностороннього ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0.0001$ - відмінності в кількості клітин AnV(+)/PI(+) відносно Dx 0,01 мкМ, -- $p \leq 0,01$, ---- $p < 0,0001$ відносно Dx 0,05 мкМ, ■ ■ $p \leq 0,01$, ■ ■ ■ $p < 0,0001$ відносно Dx 0,5 мкМ).

Наступним етапом дослідження було з'ясування, чи виявлена цитопротекторна дія NSE обумовлена його власною антиоксидантною активністю, чи, вирогідніше, є наслідком вбудовування NSE у плазматичні мембрани оброблених клітин. Для цього було проведено визначення рівня продукції активних

форм оксигену (АФО) методом проточної цитофлуориметрії в клітинах Т-лейкозу людини під впливом доксорубіцину та різних доз NSE. Незначний інгібіторний ефект NSE (у дозах 10 мкМ та 20 мкМ) щодо продукції АФО спостерігався лише для гідроген пероксиду, тоді як на супероксидні-аніон-радикали, які є основною причиною кардіотоксичності доксорубіцину, NSE не чинила впливу (див. Рис. 15 В).

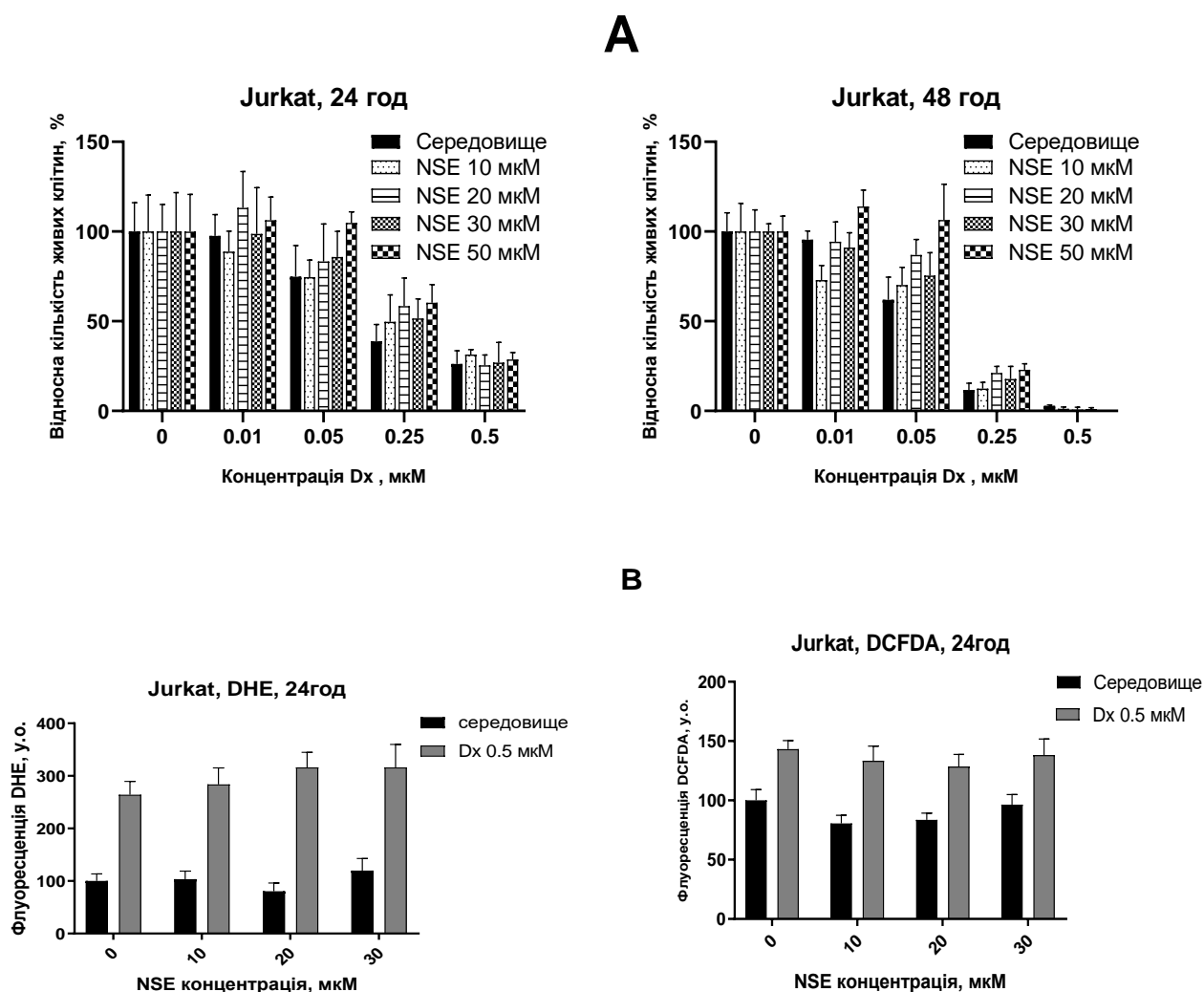


Рис. 15. Комбінована дія NSE та Dx *in vitro*. (А) Життєздатність Т-клітин лінії Jurkat після обробки різними концентраціями Dx та NSE протягом 24 год та 48 год, проаналізовано методом виключення трипанового синього. Наведені дані представляють середнє значення \pm SD трьох незалежних експериментів, виконаних у триразовій повторності. (В) Вплив комбінованої дії NSE та Dx на продукцію H_2O_2 та $O_2^{\cdot -}$ у клітинах Т-лімфоцитів лінії Jurkat. Проточна цитофлуориметрія, забарвлення DCFDA та DHE, відповідно, 24 год інкубації

Отже нами встановлено, що NSE виявляє широкий спектр біологічної активності щодо злоякісних клітин людини, викликаючи пригнічення життєздатності при високих концентраціях (30-40 мкМ), але не впливає на псевдонормальні клітини. Це свідчить про вибірковість його дії. NSE спричиняє зупинку клітинного циклу злоякісних клітин у фазі G1.

Водночас, вираженої антиоксидантної активності цього ліпиду у комбінації з доксорубіцином не виявлено, оскільки він практично не впливає на рівень гідроген пероксиду та супероксидних-аніон-радикалів у клітинах-мішенях і не змінює оксидативний стрес, спричинений доксорубіцином, у клітинах лінії Jurkat T-лейкозу людини. Хоча NSE частково знижував цитотоксичну дію доксорубіцину на 48-й годині дії, значної цитопротекторної та антиоксидантної активності в умовах сумісного застосування не виявлено.

З метою підвищення ефективності дії NSE у комбінації з доксорубіцином, їх було іммобілізовано на інноваційному полімерному нанорозмірному носії та проведено всебічне дослідження біологічної активності отриманого комплексу *in vitro* та *in vivo*.

3.1.3. Модуляція цитотоксичної дії доксорубіцину на пухлинні клітини *in vitro* за допомогою іммобілізації протипухлинного антибіотику на полімерних носіях, функціоналізованих різними типами N-ацилетаноламінів

У частині 3.1.2 розділу «Результати» ми показали, що NSE слабо впливає на дію Dx *in vitro*. Тому подальші зусилля були спрямовані на підвищення біодоступності NSE шляхом його іммобілізації на полімерному носії на основі полі(5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-ко-гліцидилметакрилату)-графтПЕГ для цільової доставки Dx. Було використано кілька рецептур зі змінним співвідношенням Dx і NSE, і для подальших досліджень було обрано найстабільніший композит, що містить 1 частину Dx і 1 частину NSE (еквівалентно молярному співвідношенню 1:1,82).

Було проведено порівняльне дослідження цитотоксичної активності нанокompозитів, функціоналізованих N-ацилетаноламінами з різною довжиною

вуглеводневого ланцюга, щодо злоякісних клітин *in vitro*. Результати, наведені на Рис. 16, показують, що ні нативний полімерний носій, ані його комплекси з NSE чи NPE суттєво не володіють вираженим цитотоксичним ефектом. Dх приводить до загибелі пухлинних клітин, починаючи з концентрації 0,5 мкМ. Очікувано, що доксорубіцин знижував життєздатність клітин лінії MCF-7 та L1210. Встановлено, що активність комплексу Dх-PC-NPE (16 метиленових груп у ліпідному ланцюзі) по відношенню до клітин MCF-7 була на 20-30% нижчою, ніж у Dх-PC-NSE (18 метиленових груп у ліпідному ланцюзі) (Рис. 16). Цей ефект також спостерігався для клітин лейкозу L1210, але лише за вищих концентрацій Dх (2 мкМ). Таким чином, довжина ланцюга жирних кислот у молекулі N- ацилетаноламіну, іммобілізованого на PC, відіграє важливу роль у посиленні проникнення протипухлинних препаратів у пухлинні клітини.

Аналіз результатів оцінки цитотоксичної активності щодо панелі пухлинних ліній представлено в таблиці 3. Показано, що спільна іммобілізація Dх та NSE на ПН приводить до помітного збільшення цитотоксичної активності щодо різних ліній пухлинних клітин. Зокрема, було виявлено, що LC_{50} кон'югатів Dх-PC-NSE у 2-25 разів нижча, ніж у вільного доксорубіцину, і в 1,5-10 разів нижча, ніж у комплексу Dх-PC (табл. 3).

Однак найбільш переконливі результати були отримані щодо пухлинних клітинних ліній з фенотипом MDR, що характеризується гіперекспресією ABC-транспортувальних білків (рис. 17, табл. 3). Зокрема, на клітинах лінії SW1573/2R160 недрібноклітинного раку легені людини (характеризуються надекспресією білків-транспортів ліків Р-глікопротеїну і MRP-1) дія наноконструкції доксорубіцину з іммобілізованим NSE (Dх-PC-NSE) була в 10 разів вищою ($LC_{50} = 0,85$ мкМ) порівняно з нативним доксорубіцином ($LC_{50} = 11,02$ мкМ). Іммобілізація Dх на полімерному носії без NSE не впливала на його властивості долати множинну лікарську резистентність ($LC_{50} = 9,32$ мкМ). Для чутливих клітин лінії SW1573 різниця у дії доксорубіцину на носії з NSE та дії нативного доксорубіцину була менш вираженою.

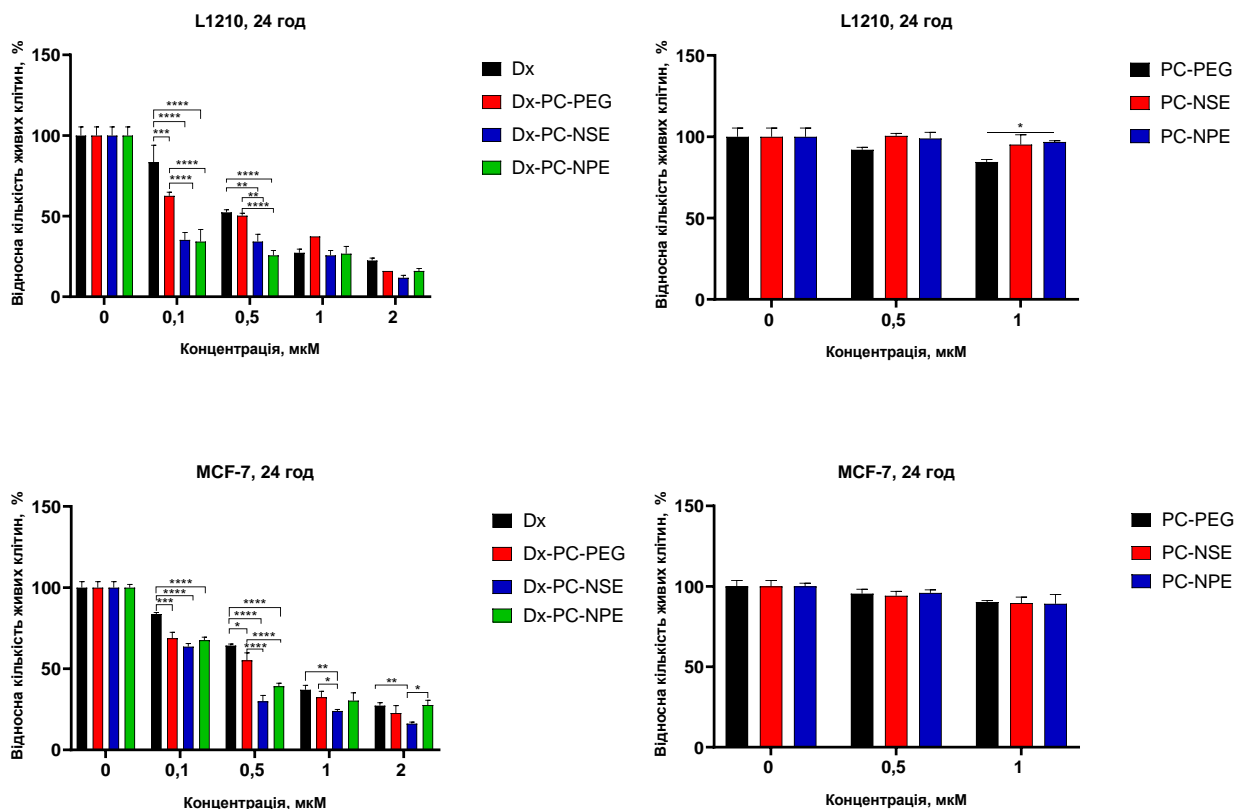


Рис. 16. Порівняння цитотоксичної активності нанокмпозитних комплексів з іммобілізованим доксорубіцином та різними NAE по відношенню до клітин лейкозу L1210 миші та клітин MCF-7 аденокарциноми молочної залози. Вплив досліджуваних сполук на ріст клітин визначали відносно нелікованого контролю. Проаналізовано методом виключення трипанового синього. Наведені дані представляють середнє \pm SD трьох незалежних експериментів, виконаних у триразовій повторності. Достовірність по відношенню до інших обробок розраховували за допомогою непарного t-критерію Ст'юдента (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Таблиця 3. Значення LC₅₀ Dx, Dx-PC та Dx-PC-NSE щодо ліній пухлинних клітин ссавців *in vitro*. 24 год інкубації, аналіз з трипановим синім

Сполуки	LC ₅₀ для клітинних ліній, мкМ (M \pm SD)							
	Jurkat	MCF-7	L1210	HeLa	SW1573	SW1573/2R160	HL-60	HL-60/adr
Dx	0.52 \pm 0.09	0.71 \pm 0.04	0.49 \pm 0.04	1.03 \pm 0.15	1.03 \pm 0.06	11.02 \pm 0.12	0.17 \pm 0.02	37.99 \pm 0.56
Dx-PC	0.45 \pm 0.13	0.42 \pm 0.05	0.32 \pm 0.05	0.98 \pm 0.18	0.13 \pm 0.01	9.32 \pm 0.11	0.19 \pm 0.03	11.11 \pm 0.21
Dx-PC-NSE	0.32 \pm 0.07	0.20 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.53 \pm 0.09	0.05 \pm 0.005	0.85 \pm 0.07	0.09 \pm 0.01	6.24 \pm 0.09

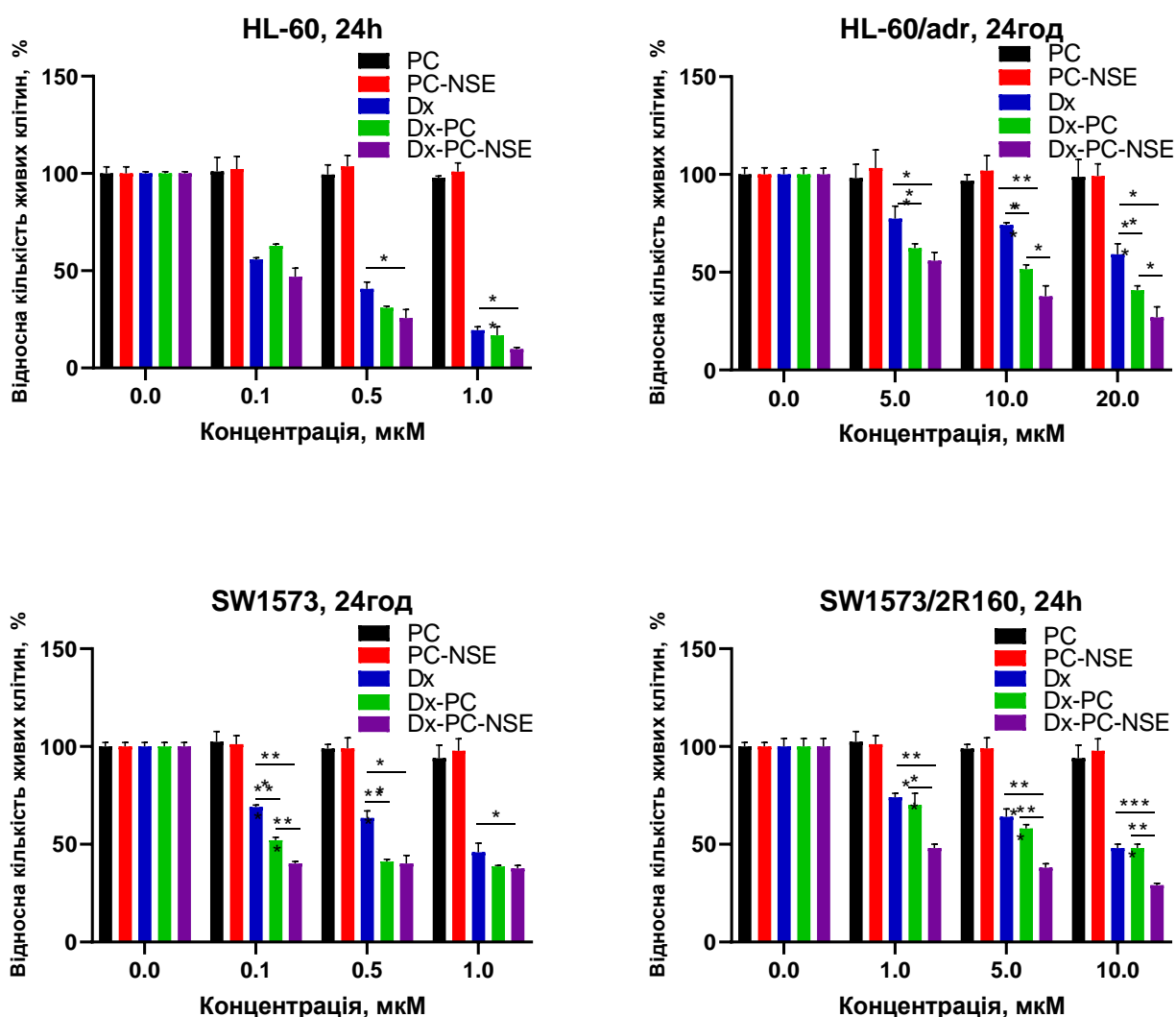


Рис. 17. Порівняння цитотоксичної активності полімерних міцел з іммобілізованими Dx та/або NSE *in vitro* по відношенню до клітин SW1573 недрібноклітинного раку легень людини та його медикаментозно-стійкої сублінії SW1573/2R160 (ABCB1+), а також клітин HL-60 лейкозу людини та її Dx-стійкої сублінії HL-60/adr (ABCC1+). Вплив досліджуваних сполук на ріст клітин визначали відносно контролю без лікування. Наведені дані представляють середнє \pm SD трьох незалежних експериментів, виконаних у триразовій повторності. Достовірність по відношенню до інших обробок розраховували за непарним t-критерієм Ст'юдента (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) PC – полімерний наноносій; PC-NSE – NSE-полімерний носій нанокомпозит; Dx-PC – Dx- полімерний носій нанокомпозит; Dx-PC-NSE – Dx-NSE- полімерний носій нанокомпозит- NSE.

Аналогічний ефект спостерігали на клітинах лінії HL-60/adr (ABCC1+), які є резистентними до цього антибіотику внаслідок надекспресії білка-транспортера ліків MRP-1 (Рис. 17, табл. 3). Це свідчить про універсальність механізмів дії цих носіїв щодо долаття резистентності пухлин до ліків. Можливим поясненням цього ефекту є виражена ліпофільність дії систем доставки доксорубіцину, які містять NSE. Це полегшує і пришвидшує доставку доксорубіцину всередину клітини і тим самим зменшує роботу білків-транспортерів ліків.

Резистентність до протипухлинних препаратів можна досягти або шляхом пригнічення активності ABC-транспортерів за допомогою специфічних малих молекул (наприклад, верапамілу), або шляхом посилення проникнення протипухлинного препарату в цитоплазму або ядра таким чином, щоб він не був вразливим до опосередкованого ABC-транспортером відтоку з мембранного бішару.

Для оцінки здатності NSE полегшувати проникнення Dх-полімерного носія в клітини, було проведено цитоморфологічне дослідження на клітинах лінії HeLa. Результати показали, що через 6 год після обробки Dх (2 мкМ) флуоресценція препарату виявлялася в цитозолі клітин, але не в їхніх ядрах (Рис. 18). Водночас у цих клітинах було зафіксовано початок конденсації хроматину, що є ранньою ознакою апоптозу. Однак інших виражених цитоморфологічних ознак апоптозу, таких як утворення виступів на поверхні клітинної мембрани або апоптичних тілець, не спостерігалось. Збільшення концентрації Dх до 4 мкМ призводило до ще більшого проникнення препарату в ядра клітин-мішеней, а також до більш виражених ознак апоптозу, зокрема утворення апоптичних тілець.

Імобілізація Dх на полімерному носії посилювала проникнення препарату в ядра клітин-мішеней, але цей ефект став помітним тільки при дозі 4 мкМ (Рис. 18). У таких клітинах були виявлені чіткі апоптотичні зміни, зокрема здуття мембран і утворення апоптичних тілець. У випадку додавання NSE до системи доставки Dх (ПК з 3% w/v як Dх, так і NSE, молярне співвідношення Dх:NSE - 1:1,82) флуоресценція препарату виявлялася в ядрах клітин навіть при меншій дозі 2 мкМ. Таким чином, наявність NSE у складі навантаженого Dх ПК значно (у 2 рази)

підвищувала проникнення цього препарату в ядро, тобто ефективніше, ніж сам полімерний носій.

Ці результати підтверджують наше припущення, що ліпофільність молекул NSE сприяє покращенню проникнення доксорубіцину в клітини-мішені, а отже, посилює його ефективність при аналогічній концентрації, порівняно з доксорубіцином у нативному вигляді. Для перевірки цієї гіпотези було проведено дослідження здатності вільного доксорубіцину, доксорубіцину, іммобілізованого на носії, та доксорубіцину, іммобілізованого на носії і функціоналізованого NSE, проникати в клітини карциноми шийки матки лінії HeLa.

Результати показали, що через 6 год після обробки доксорубіцином (2 мкМ) препарат локалізувався в апараті Гольджі та цитозолі клітини, але не проникав у ядро (Рис. 18). При цьому не було зафіксовано виражених ознак апоптозу, таких як конденсація хроматину чи утворення апоптичних тілець. Збільшення концентрації доксорубіцину до 4 мкМ посилювало його проникнення в клітини-мішені та прояв апоптичних ознак, але навіть за цієї концентрації препарат не локалізувався виключно в ядрі.

Іммобілізація доксорубіцину на нанорозмірному носії значно посилювала його проникнення в ядро клітин-мішеней та призводила до появи апоптичних клітин. Однак ці явища були помітні лише при застосуванні високої дози доксорубіцин-нанокомпозитного комплексу (4 мкМ). За нижчої дози (2 мкМ) різниці в порівнянні з дією нативного доксорубіцину не спостерігали.

Як показано на Рис. 18, вже при концентрації 2 мкМ Dx-NSE-нанокомпозит проникає в ядра клітин лінії HeLa та індукує інтенсивний апоптоз, що є ефектом, еквівалентним дозі 4 мкМ нативного доксорубіцину. Збільшення концентрації Dx-NSE-нанокомпозиту до 4 мкМ приводило до повного апоптозу клітин і яскравого свічення клітин в червоному каналі (570 нм), що свідчить про ефективне проникнення доксорубіцину в клітини.

Отже, функціоналізація доксорубіцин-вмісних полімерних носіїв N-стеароїлетаноламіном значно покращує проникнення препарату в клітини-мішені, що сприяє 2-кратному посиленню його протипухлинної активності у порівнянні з

нативним доксорубіцином при однакових концентраціях. Цей ефект можна пояснити збільшеною ліпофільністю таких систем доставки ліків, оскільки нефункціоналізовані носії не мали значного впливу ні на проникнення, ані на цитотоксичну дію доксорубіцину *in vitro*.

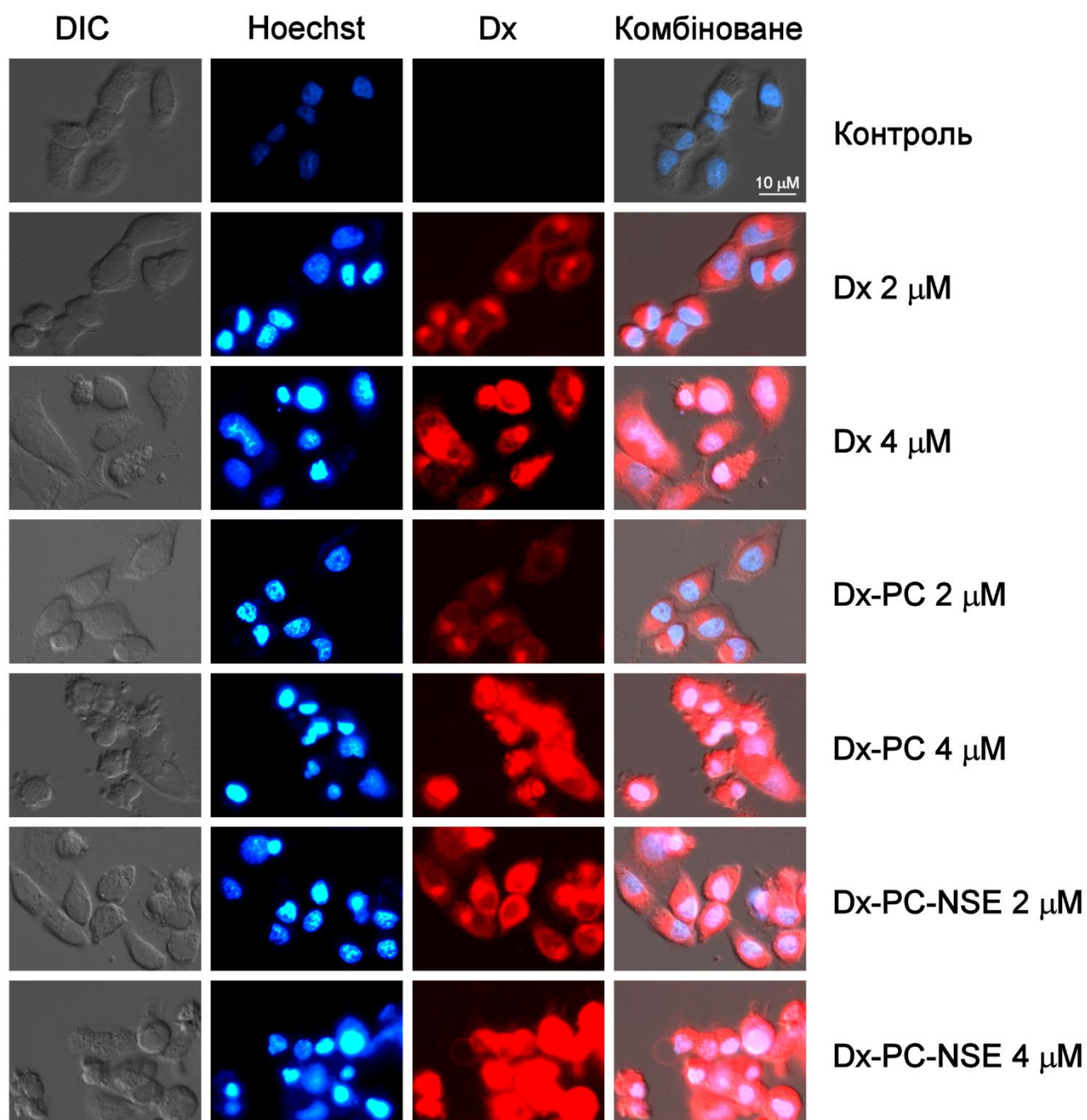


Рис. 18. Зміни ультраструктури ядра та накопичення Dx у клітинах лінії HeLa карциноми шийки матки людини за обробки різними концентраціями Dx, Dx-NC, Dx-NC-NSE. Фарбування Hoechst 33342, люмінесцентна мікроскопія, 6 год інкубації, x40.

3.1.4. Вплив спільної іммобілізації Dх та NSE на PC на рівень АФО та індукцію загибелі пухлинних клітин *in vitro*.

Для дослідження впливу прискореної доставки доксорубіцину (Dх) в пухлинні клітини за допомогою NSE-функціоналізованого полімерного комплексу (ПК) на механізм його дії було вивчено зміни в клітинному циклі, рівнях активних форм кисню (АФО), функціональному стані мітохондрій та активації сигнальних шляхів, що сприяють апоптозу. Виявлено, що посилене проникнення Dх у пухлинні клітини, яке викликане NSE-вмісними полімерами, значно змінює розподіл клітинного циклу (Рис. 14). При концентрації 0,1 мкМ Dх спостерігали помірне збільшення піку G2, тоді як при використанні комплексу Dх-PC-NSE за тієї ж концентрації було зафіксовано повний G2-блок в клітинах Jurkat. Аналогічний ефект спостерігався і за п'ятикратного збільшення дози Dх до 0,5 мкМ.

При використанні комплексу Dх-PC-NSE в еквімолярних концентраціях з'являються додаткові зміни в розподілі клітинного циклу, особливо відзначається збільшення частки клітин у S-фазі (Рис. 20А). Це свідчить про участь NSE-функціоналізованих полімерів у регулюванні не тільки G2-арешту, але й у впливі на інші фази клітинного циклу.

Ці зміни в клітинному циклі супроводжувалися зниженням рівня супероксидних аніон-радикалів (Рис. 20С), особливо на ранніх часових інтервалах (1 год), що спостерігали як при низьких (2 мкМ), так і за високих концентрацій Dх (4 мкМ). Оскільки супероксидні аніон-радикали в основному продукують мітохондрії, часткове зниження їхньої продукції, що спостерігалось при застосуванні комплексів Dх-PC-NSE, може бути пов'язане з вбудовуванням NSE у зовнішню мембрану мітохондрій, що індукується переносником. Це, в свою чергу, сприяє стабілізації мітохондріальних функцій протягом обмеженого часу. У пізніші часові інтервали (3, 6, 12 год) спостерігали схожі тенденції, але без статистичної значущості (Рис. 20С).

Що стосується рівня гідроген пероксиду, то його концентрація не змінювалася у клітинах, оброблених Dх або Dх-PC-NSE, в жоден з досліджених часових періодів (Рис. 20В). Оскільки H_2O_2 в клітинах ссавців переважно продукується

мембранними НАДФН-оксидазами, а відсутність коливань рівня цього пероксиду при обробці Dх-PC-NSE вказує на часткове пригнічення продукції супероксидних радикалів в мітохондріях, це може бути зумовлено антиоксидантними властивостями NSE, що модулюють діяльність мітохондріальних функцій.

Для подальшого підтвердження цієї гіпотези було проведено забарвлення клітин лінії Jurkat за допомогою JC-1 для визначення мембранного потенціалу мітохондрій за дії Dх, Dх-PC та Dх-PC-NSE (Рис. 19А). Очікувано, на 3 і 6 годин не спостерігалось змін мембранного потенціалу мітохондрій, проте на 9-ту годину обробка Dх (2 мкМ) викликала слабку деполяризацію мітохондрій, яка частково зменшувалася при застосуванні комплексу Dх-PC-NSE, але не Dх-PC. За застосування вищої дози Dх (4 мкМ) через 9 і 12 год спостерігали фактичне зменшення кількості деполяризованих мітохондрій порівняно з меншою дозою (2 мкМ), незважаючи на масову загибель клітин, що підтверджено результатами тесту з трипановим синім (Рис. 19В).

Ми припускаємо, що при високих концентраціях Dх переважно відбувається інтеркаляція в ДНК, а не участь мітохондрій у редокс-циклі, що пояснює слабке залучення мітохондріальної активності в цьому випадку. Тим не менш, було виявлено, що PC-NSE зменшує кількість деполяризованих мітохондрій у інтервалі часу 9 год, що підтверджує наше припущення про мітохондріально-стабілізуючу функцію NSE.

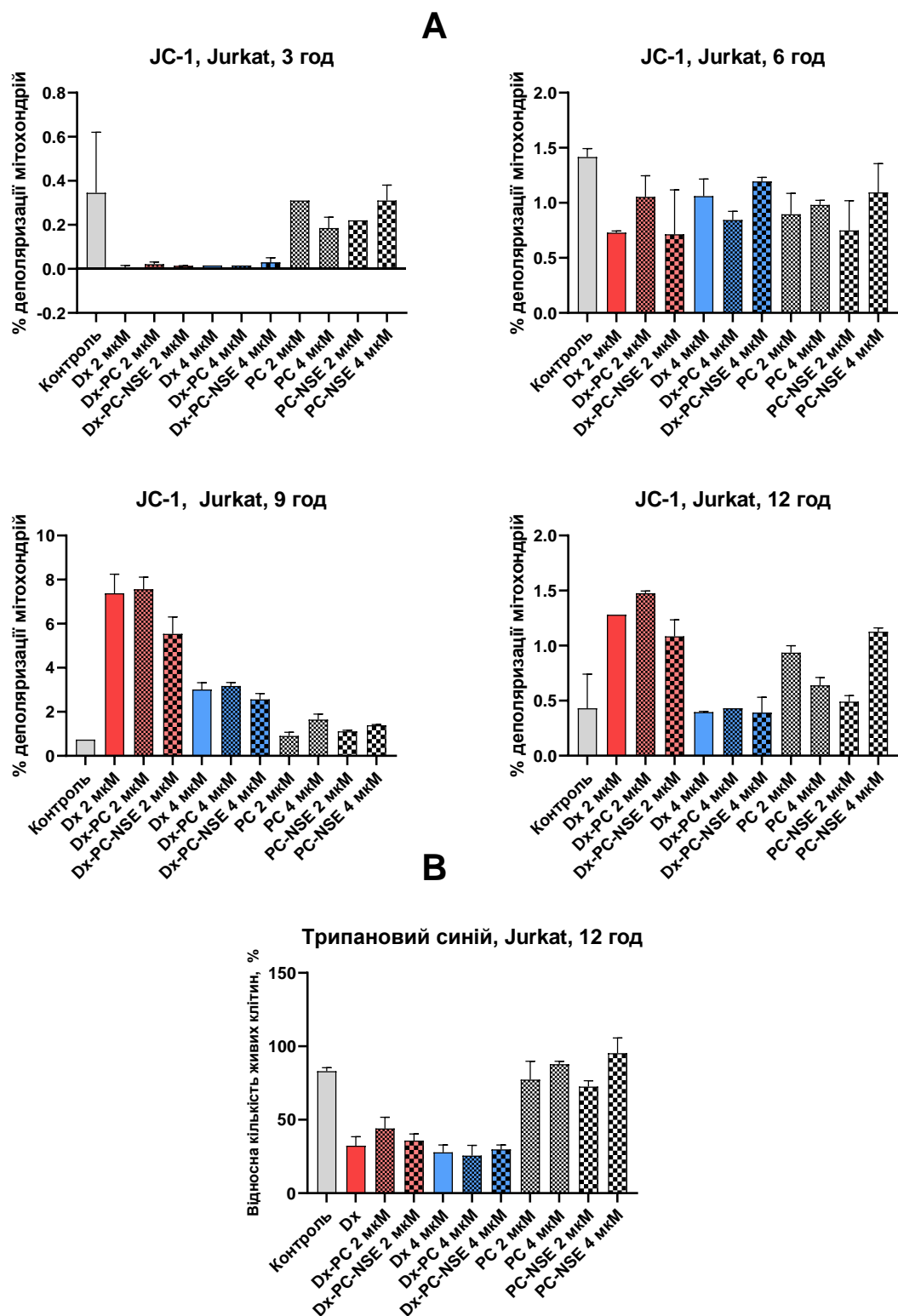


Рис. 19. Залежний від часу вплив Dx, Dx-PC та Dx-PC-NSE на деполяризацію мітохондрій клітин Jurkat та їхнє виживання. (А) Проточна цитофлуориметрія, забарвлення JC-1. (В) Тест на виключення трипанового синього. Наведено один з трьох експериментів, в яких отримано порівняльні дані.

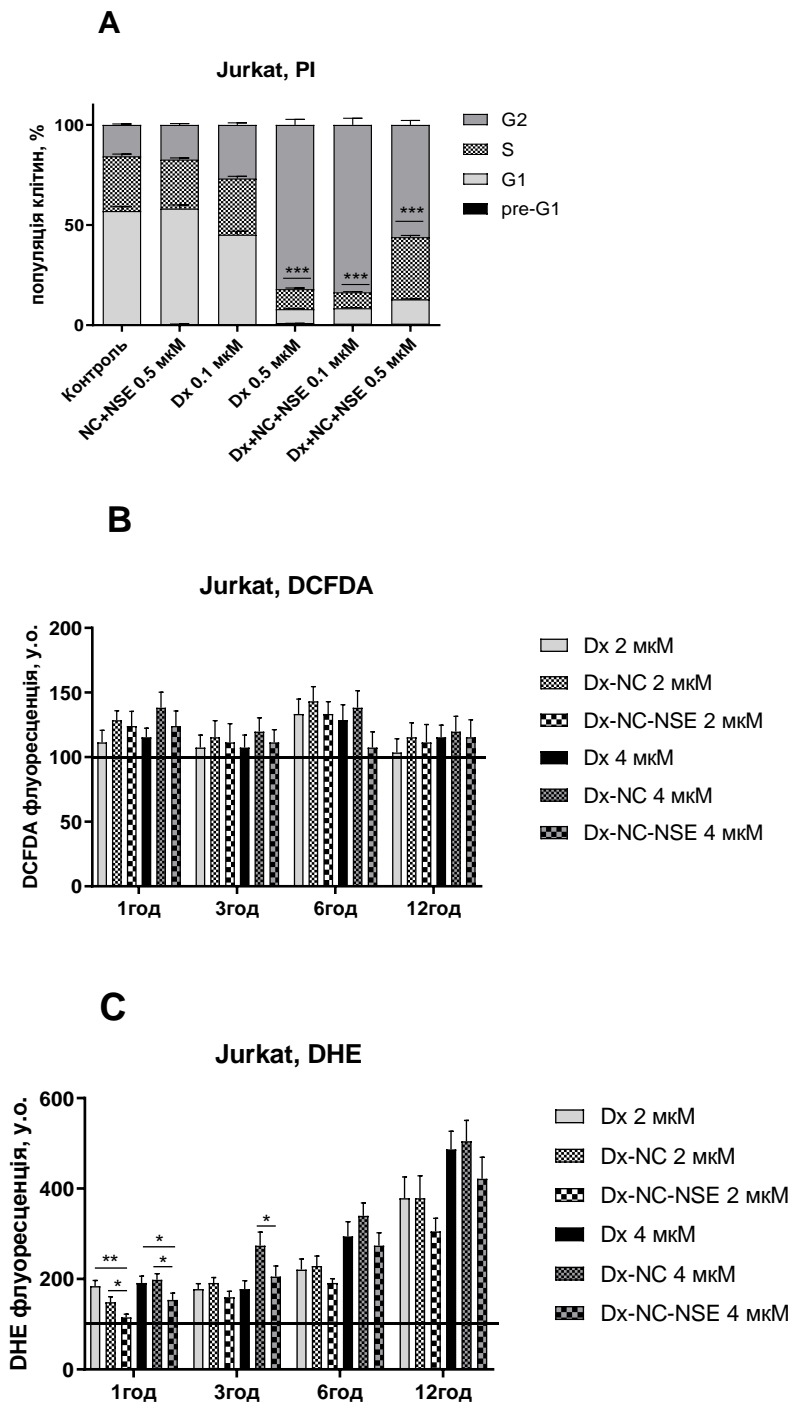


Рис. 20. Аналіз впливу спільної іммобілізації Dx та NSE на ПК на розподіл фаз клітинного циклу та індукцію АФО у Т-клітинах лінії Jurkat. (А) Зміни в розподілі фаз клітинного циклу, забарвлення PI, 24 год інкубації. (В) Часозалежні дослідження продукції H_2O_2 , аналіз DCFDA, 1,3,6,12 год інкубації. (С) Часозалежні дослідження продукції $\text{O}_2^{\cdot -}$, DHE-аналіз, 1,3,6,12 год інкубації. Дані наведено відносно необроблених контрольних зразків (вихідний рівень) і являють собою середнє значення \pm SD трьох незалежних експериментів. Достовірність по відношенню до інших обробок розраховували за допомогою непарного t-критерію Ст'юдента. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Для підтвердження цих даних, проведено Вестерн-блот-аналіз залежно від часу активації ключових сигнальних шляхів апоптозу в клітинах Jurkat за дії Dх, Dх-РС та Dх-РС-NSE (Рис. 21). Цей метод дозволяє дослідити динаміку активації каспаз та інших білків, що беруть участь у ранніх і пізніх стадіях апоптозу, що забезпечує детальне розуміння механізмів клітинної смерті під впливом досліджуваних препаратів.

Обробка Т-клітин лінії Jurkat Dх у концентрації 2 мкМ призводила до слабкого розщеплення ініціаторних каспаз-8, -9, -10 в усіх часових точках (3, 6, 9 та 12 год). Це підтверджує результати JC-1 методу, які вказують про незначне залучення мітохондрій до загибелі клітин, індукованої Dх у високих дозах. Такий механізм може бути пов'язаний із прямим впливом Dх на ДНК або іншими позамітохондріальними шляхами, що вимагають подальшого вивчення. Застосування Dх-РС-NSE продемонструвало значно іншу динаміку. Активація (розщеплення) ініціаторної каспази-9, ключового білка мітохондріального апоптозу, спостерігалася лише через 9 год після обробки, тоді як у випадку Dх і Dх-РС цей ефект фіксувався вже через 3 год (Рис. 21). Така затримка може свідчити про часткове блокування або модифікацію мітохондріального шляху, ймовірно, через зменшення продукції активних форм кисню (АФО), що є важливими тригерами мітохондріальної дисфункції.

Натомість ефекторна каспаза-3, основний білок, що відповідає за розщеплення субстратів під час апоптозу, виявила підвищену активність після обробки Dх-РС-NSE. Її активація була значно сильнішою порівняно з Dх та Dх-РС, що може свідчити про перехід до каспазо-залежного апоптозу, менш пов'язаного з мітохондріями. Такий механізм вказує на залучення альтернативних сигнальних шляхів апоптозу, зокрема рецептор-залежного каспазного каскаду, що потребує подальших досліджень.

У пізні часові інтервали (12 год) Dх-РС-NSE призводив до повного розщеплення ключових субстратів апоптозу, таких як PARP-1 і DFF45, а також прокаспаз-2, -8 і -10. Це свідчить про повну активацію як мітохондріального, так і рецепторного шляхів апоптозу. Водночас Dх і Dх-РС у тих самих концентраціях (2

мкМ) виявили лише часткову активацію цих білків, що вказує на нижчу ефективність цих форм препарату в ініціації клітинної загибелі.

Отримані результати підтверджують змінений і більш потужний проапоптичний потенціал Dх-PC-NSE щодо пухлинних клітин Jurkat *in vitro*. Зокрема, затримка активації мітохондріального шляху апоптозу може бути вигідною для запобігання передчасній резистентності клітин, тоді як сильніша активація ефекторних каспаз сприяє ефективнішій елімінації пухлинних клітин.

Часткове пригнічення мітохондріальної продукції АФО під дією Dх-PC-NSE, імовірно, пояснює затримку активації каспази-9. Водночас підвищена активність каспази-3 може бути пов'язана із залученням альтернативних шляхів апоптозу, таких як рецептор-залежний апоптоз, опосередкований через активацію каспази-8. Синергія між цими шляхами, зумовлена Dх-PC-NSE, вказує на багатовекторну дію цього композиту на клітини Jurkat.

Аналіз даних вказує, що Dх-PC-NSE може бути більш ефективним засобом для терапії Т-лейкемії порівняно з традиційними формами Dх, особливо у випадках, коли мітохондріальний шлях апоптозу зазнає інгібування через клітинну резистентність. Стабільна активація каспаз та інтенсивне розщеплення субстратів на пізніх стадіях апоптозу роблять Dх-PC-NSE перспективним кандидатом для подальшого вивчення в контексті протипухлинної терапії.

Часткове пригнічення мітохондріального шляху апоптозу, яке спостерігалось під час обробки клітин Dх-PC-NSE, може бути пов'язане зі зниженням продукції АФО, що відіграє ключову роль у мітохондріальній дестабілізації. Водночас підвищена активація каспази-3 вказує на залучення альтернативних сигнальних шляхів апоптозу, можливо, через рецептор-залежні механізми або інші цитоплазматичні фактори.

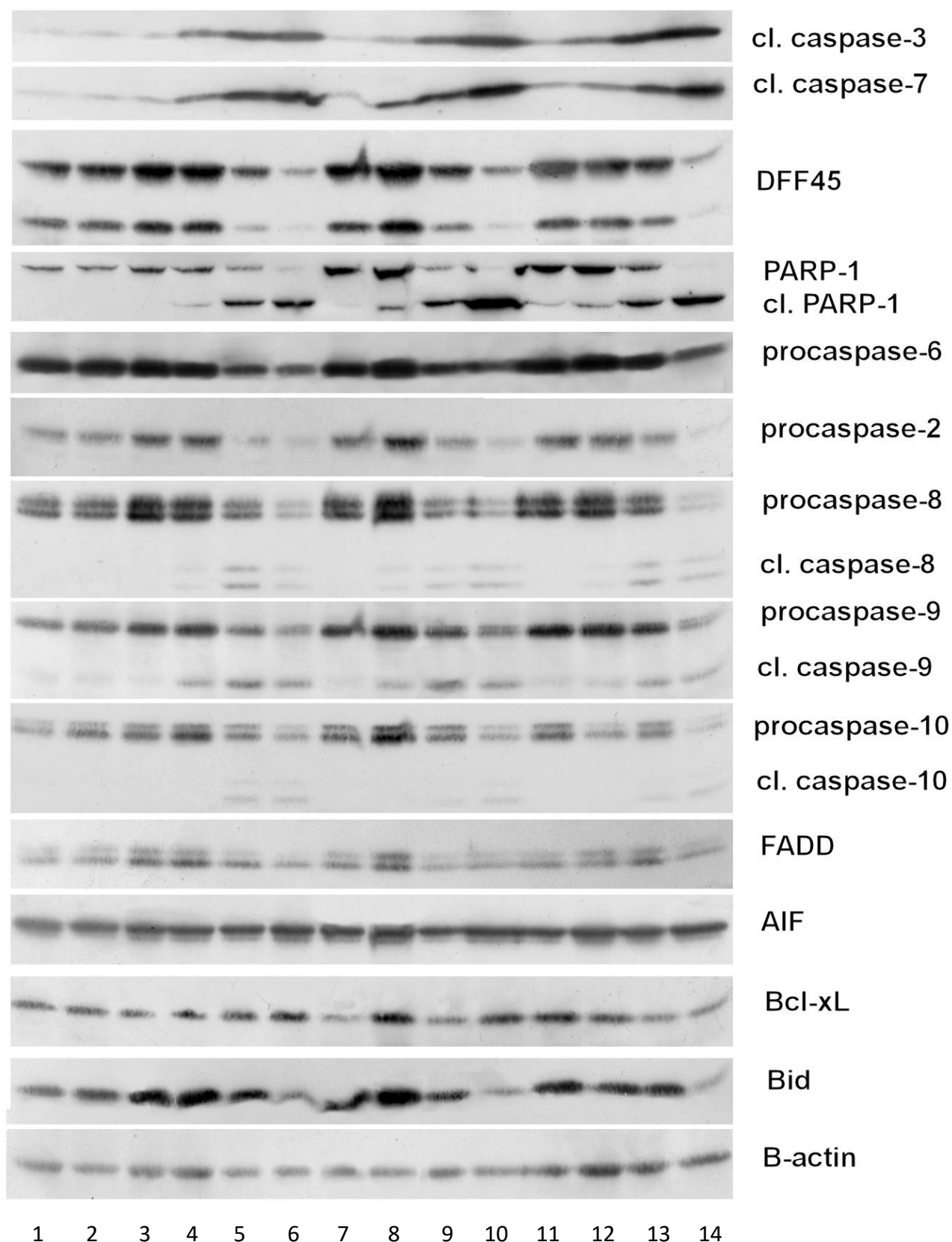


Рис. 21. Залежні від часу зміни в сигнальних шляхах клітинної загибелі в Т-клітинах лінії Jurkat під впливом різних концентрацій Dх, Dх-NC та Dх-NC-NSE

1 – контроль	6 – Dx, 2 мкМ, 12 год	11 – Dx+PC+NSE, 2 мкМ, 3 год
2 – PC+NSE, 2 мкМ, 24 год	7 – Dx+PC, 2 мкМ, 3 год	12 – Dx+PC+NSE, 2 мкМ, 6 год
3 – Dx, 2 мкМ, 3 год	8 – Dx+PC, 2 мкМ, 6 год	13 – Dx+PC+NSE, 2 мкМ, 9 год
4 – Dx, 2 мкМ, 6 год	9 – Dx+PC, 2 мкМ, 9 год	14 – Dx+PC+NSE, 2 мкМ, 12 год
5 – Dx, 2 мкМ, 9 год	10 – Dx+PC, 2 мкМ, 12 год	

Результати експерименту підтверджують, що Dx-PC-NSE виявляє більш потужний проапоптичний ефект, ніж інші форми Dx, зокрема через його здатність ініціювати швидке розщеплення субстратів каспаз-3, -8, -9 і повністю активувати каспазу-2. Особливо важливо, що Dx-PC-NSE забезпечує стабільну активацію апоптозу навіть за умов пригнічення мітохондріальних механізмів, що робить цей композит перспективним для терапії пухлин із резистентністю до стандартних хіміопрепаратів. Затримка активації мітохондріальних шляхів апоптозу за дії Dx-PC-NSE є важливою ознакою, яка свідчить про зміну сигнальних шляхів клітинної загибелі.

Для вивчення фармакокінетики та біодоступності нанорозмірних комплексів доксорубіцину було проведено дослідження динаміки вивільнення лікарських засобів та їх проникнення у клітини. На Рис. 22 представлено результати довготривалого кількісного аналізу вивільнення доксорубіцину (Dx) з його комплексів із полімерним носієм та його проникнення в Т-клітини Jurkat. (B) FACS-аналіз проникнення цих форм препарату у клітини Jurkat *in vitro*. Ці результати дозволяють оцінити контрольоване вивільнення та ефективність доставки Dx за допомогою полімерних комплексів.

Часозалежна динаміка вивільнення вільного Dx, Dx-PC та Dx-PC-NSE через діалізну мембрану показала, що найшвидше вивільнення спостерігається для вільного доксорубіцину, який досягає близько 90% вивільнення менш ніж за 100 хв. Це вказує на високу швидкість дифузії нативного доксорубіцину через діалізну мембрану. Інкапсуляція доксорубіцину у полімерні міцели Dx-PC значно уповільнює процес вивільнення. На 100-й хвилині вивільнено близько 50% препарату, а повне вивільнення триває до 300 хв. Це свідчить про формування стабільного носія, який поступово вивільняє молекули доксорубіцину.

Найповільніше вивільнення спостерігається для комплексу Dх-PC-NSE. Через 100 хв вивільнено лише близько 40% препарату, і процес триває протягом усього періоду спостереження. Це вказує на додаткову стабілізацію комплексу завдяки присутності NSE, яка зменшує швидкість вивільнення.

На графіках Рис. 22 (В) представлено FACS-аналіз часозалежної динаміки проникнення Dх, Dх-PC та Dх-PC-NSE у Т-клітини лінії Jurkat за двох концентрацій (2 мМ та 4 мМ). Вільний доксорубіцин швидко накопичується в клітинах, генеруючи поступове зростання сигналу флуоресценції протягом 360 хв. Комплекс доксорубіцину на полімерному носії (Dх-PC) проникає повільніше, ніж вільний Dх, але забезпечує стабільне накопичення, що свідчить про поступову внутрішньоклітинну доставку препарату. Нанокмпозит Dх-PC-NSE виявляє найбільш виражене накопичення Dх у клітинах до кінця експерименту, перевищуючи рівні для вільного Dх та Dх-PC. Це свідчить про ефективну доставку молекули за участю NSE, яка забезпечує тривале накопичення препарату.

При вищій концентрації взятих препаратів (4 мМ) спостерігали подібне зростання флуоресцентного сигналу для всіх зразків. Dх-PC-NSE аналогічно забезпечує максимальне проникнення, особливо у пізні часові точки (після 240 хв), що підтверджує перевагу даного комплексу для ефективної доставки доксорубіцину у клітини. Ці результати свідчать, що збільшення цитотоксичної активності Dх-PC-NSE *in vitro* може бути зумовлене двома різними механізмами: посиленням проникнення у клітини-мішені завдяки підвищеній ліпофільності системи доставки препарату (стадія 1, до 90 хв), а потім посиленням вивільнення Dх у цитозолі пухлинних клітин за допомогою PC-NSE (стадія 2, з 90 хв до 360-720 хв залежно від концентрації Dх). У всіх випадках, ефективність доставки та вивільнення доксорубіцину комплексом Dх-ПК (без NSE) була нижчою, порівняно з Dх-ПК-NSE, що підтверджує важливу роль NSE в цьому феномені.

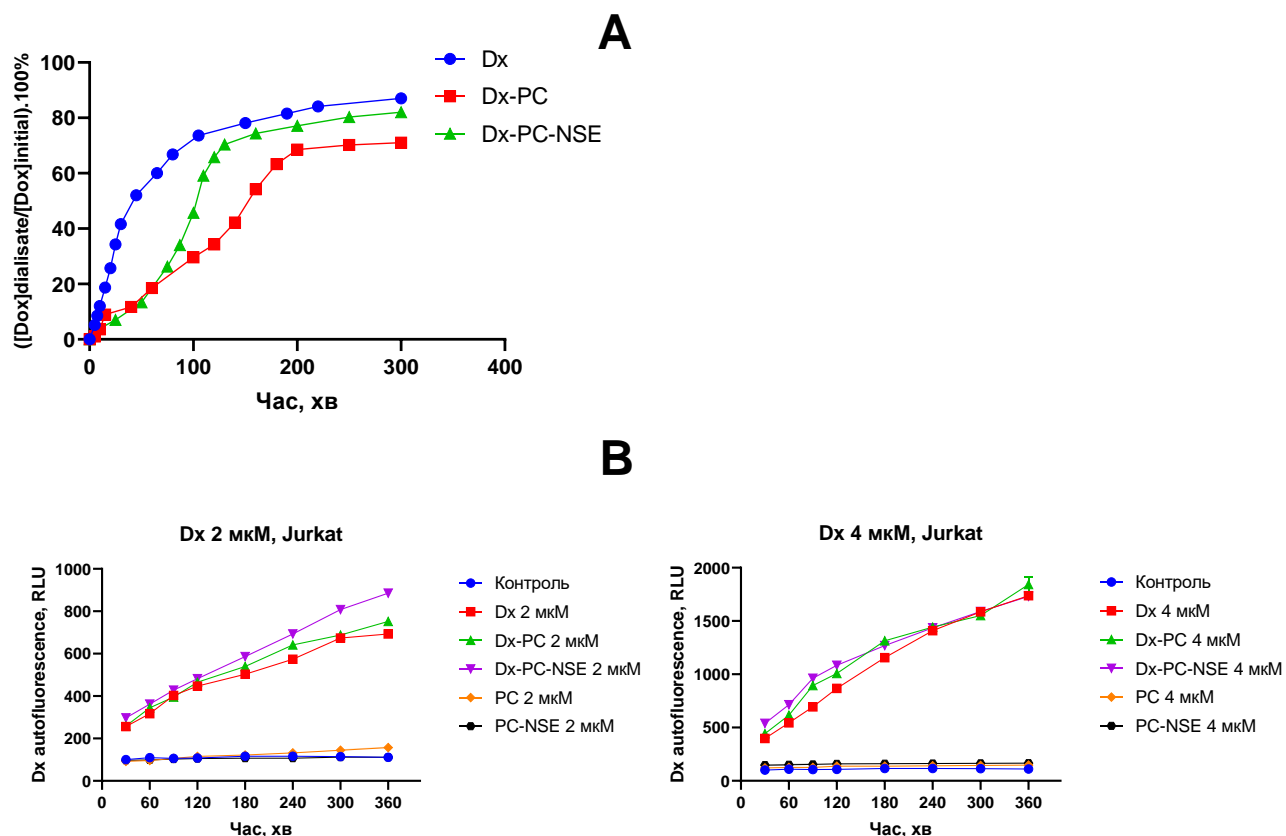


Рис. 22. Довготривалий кількісний аналіз вивільнення Dx з його комплексу з полімерним носієм та його проникнення в Т-клітини лінії Jurkat. (А) Часозалежна динаміка (0 хв - 1440 хв) вивільнення вільного Dx (1) та Dx, іммобілізованого в міцелярних комплексах Dx-PC (2) та Dx-PC-NSE (3) через діалізну мембрану у водний розчин (початкові концентрації компонентів, завантажених в діалізні трубки становили $[NSE] = 0,3$ мг/мл; $[PC] = 10$ мг/мл; $[Dx] = 0,3$ мг/мл). (В) FACS аналіз часозалежної та концентраційної динаміки проникнення Dx, Dx-PC та Dx-PC-NSE в Т-клітини Jurkat *in vitro*.

3.1.5. Дослідження активності нанокомпозитів з іммобілізованими Dx та NSE на моделях мишей.

Метою наступного дослідження було визначити здатність нанорозмірних комплексів доксорубіцину з NSE підсилювати протипухлинну активність доксорубіцину у мишей-пухлиноносіїв. Терапевтичні ефекти нанорозмірного

доксорубіцину, іммобілізованого з NSE (Dx-PC-NSE), порівнювали з дією нативного доксорубіцину та його комплексу на полімерному носії.

У нашому дослідженні було використано дві експериментальні моделі мієлоїдних пухлин у мишей - лімфома NK /Ly та лейкоз L1210. Дані пухлини суттєво відрізняються за швидкістю розвитку раку після інокуляції і відповідно – тривалістю життя тварин-пухлиноносіїв, а також за резистентністю до протипухлинних препаратів (Burger AM, 2002; Panchuk RR, 2007). Dx у низьких дозах (0,1 мг/кг, 10 ін'єкцій з 2 по 20 день після інокуляції пухлини) виявив слабкий терапевтичний ефект зі збільшенням середньої тривалості життя тварин з NK/Ly лімфомою з 21 до 36 днів, тоді як Dx-PC, навпаки, прискорював загибель тварин (скорочення тривалості життя з 21 до 16 днів). Цей ефект можна пояснити тим, що іммобілізація доксорубіцину на полімерному носії одночасно посилювала його протипухлинну дію, а також негативні побічні ефекти у тварин-пухлиноносіїв, що викликало їх швидку загибель. Застосування нанокомпозитів на основі N-вінілпіролідону, функціоналізованих цитопротекторним ліпідом N-стеароїлетаноламіном значно посилювало терапевтичний ефект, оскільки спостерігалось збільшення середньої тривалості життя з 21 до 24 днів, а деякі тварини жили на кілька днів довше, ніж тварини групи, що отримували тільки доксорубіцин (Рис. 23А). Застосування вищої дози (0,2 мг/кг) Dx продемонструвало значно кращі терапевтичні показники: збільшення тривалості життя в групі Dx з 21 до 40,5 днів, в групі Dx-PC з 21,5 до 34 днів і подальше збільшення до 49 днів в групі Dx-PC-NSE. Максимальна тривалість життя тварин, які отримували Dx-PC-NSE, становила 50 днів, тоді як у мишей, які отримували вільний Dx, загальна виживаність не перевищувала 45 днів.

Таким чином, навіть низькі дози доксорубіцину, ко-іммобілізованого з NSE на полімерному носії, давали виражене посилення терапевтичного ефекту порівняно з доксорубіцином у вільній формі. Подальше збільшення одноразової дози Dx до 0,5 мг/кг, все ще було недостатнім для повного одужання тварин (медіана виживання 51,5 дня і максимальне виживання 67 днів). Однак у групі Dx-PC лише 16% тварин були живі через 90 днів після лікування, тоді як у групі Dx-PC-NSE всі тварини не

мали жодних ознак пухлини до кінця експерименту, що свідчить про їхнє вилікування. Такий самий ефект спостерігали при застосуванні тільки Dх у кумулятивній дозі, яка рівна 10 мг/кг і є терапевтичною дозою для лікування даної лімфоми (Рис. 23А). Таким чином, застосування Dх-PC-NSE призводить до одужання мишей з лімфомою NK/Lу вдвічі меншою кумулятивною дозою вільного Dх - 5 мг/кг порівняно з 10 мг/кг. Ці результати узгоджуються з нашими даними, отриманими в дослідженнях *in vitro*, в яких комплекс Dх-PC-NSE виявив щонайменше вдвічі вищу активність, ніж вільний Dх.

Для підтвердження результатів, отриманих на лімфомі NK/Lу, було використано іншу модель пухлини мишей - лейкоз L1210. У цих експериментах доза 0,2 мг/кг Dх виявилася недостатньою для досягнення терапевтичного ефекту. Проте навіть у цьому випадку лікування тварин за допомогою Dх-PC-NSE сприяло збільшенню тривалості їхнього життя з 18 до 22 днів у порівнянні з використанням вільного Dх. При застосуванні дози Dх 0,5 мг/кг тривалість життя тварин пропорційно зростала з 10,5 до 23 днів, а максимальна загальна виживаність становила 24 дні. Препарат комплексу Dх-PC-NSE збільшив тривалість життя до 33 днів, причому 33% тварин виявляли ознаки повного одужання (тривалість життя > 90 днів) (Рис. 24В). У групах, які отримували 1 мг/кг Dх (кумулятивна доза 8 мг/кг), жодна з тварин-пухлиноносіїв не була вилікована, хоча тривалість їхнього життя збільшилася з 10,5 до 31 дня (Рис. 23В). Dх, іммобілізований на полімерному носії, збільшив тривалість життя лише на 3 дні. Натомість лікування тварин препаратом Dх-PC-NSE в аналогічній дозі забезпечило повну ремісію у всіх пролікованих тварин (виживання понад 90 днів) (Рис. 23В).

Щоб переконатися, що спостережуваний феномен не спричинений протираковою активністю вільних полімерних носіїв (PC або PC-NSE), було вивчено їхній вплив у тих самих дозах, що використовували для введення мишам (0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг та 1 мг/кг) на моделях лімфоми NK/Lу та лейкозу L1210. Нативні полімерні носії (PC та PC-NSE) не виявили терапевтичної активності ні у високих, ні у низьких дозах, про що свідчить виявлена тривалість життя тварин-пухлиноносіїв у різних моделях пухлин (Додаток 6, Рис. 40).

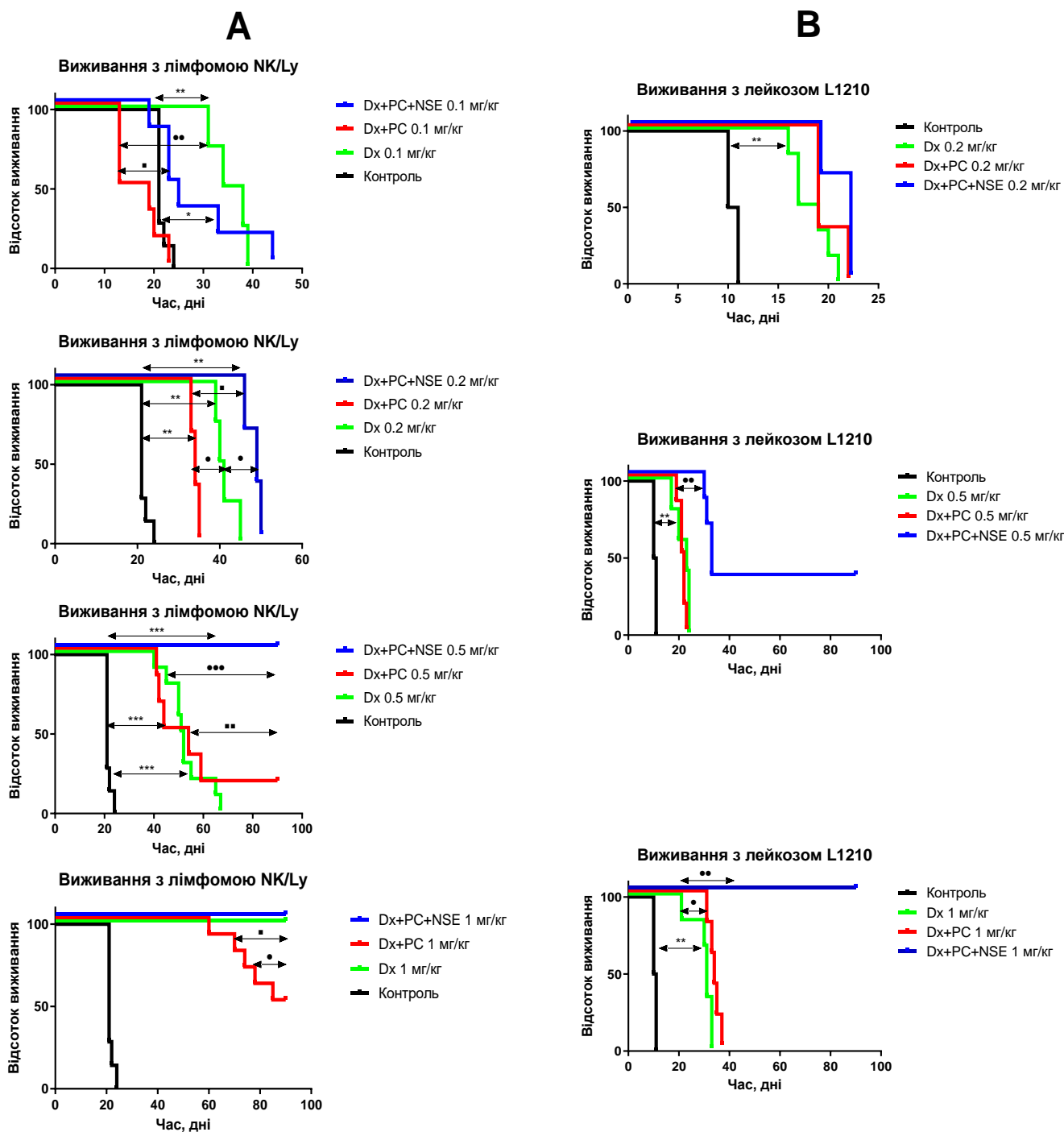


Рис. 23. Вплив спільної іммобілізації Dx та NSE на виживання мишей з лімфоною NK/Ly (A) та лейкоїї L1210 (B), відповідно. Достовірність по відношенню до інших методів лікування розраховували за критерієм Мантеля-Кокса (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ відносно контролю, - $p < 0,05$; -- $p < 0,01$; --- $p < 0,001$ відносно Dx, ■ $p < 0,05$; ■ ■ $p < 0,01$ відносно Dx-PC).

Було виявлене чітке дозозалежне посилення терапевтичної активності Dх щодо до двох типів пухлин: лімфоми NK/Lу та лейкозу L1210 за допомогою ко-імобілізованого N-стеароїлетаноламіну. Ці дані також свідчать про важливу роль NSE у модуляції негативних побічних ефектів доксорубіцину *in vivo*.

Підсумовуючи вищесказане, ми встановили, що спільна імобілізація доксорубіцину і N-стеароїлетаноламіну на полімерному носії майже вдвічі підвищує терапевтичну активність Dх у двох різних експериментальних моделях пухлин у мишей, що у деяких випадках призводить навіть до повної ремісії. Основною причиною спостережуваного ефекту є спільна імобілізація NSE і доксорубіцину на полімерному наноносії, створеному на основі N-вінілпіролідону. Терапевтична активність комплексу доксорубіцину на полімерному носії незначно відрізняється від активності доксорубіцину, що застосовувався у вільній формі.

3.1.6. Вивчення здатності NSE в складі нанорозмірного комплексу з доксорубіцином знижувати токсичну дію доксорубіцину в організмі експериментальних тварин.

Дія доксорубіцину під час хіміотерапії викликає негативні токсичні ефекти, зокрема кардіотоксичність (Goormaghtigh E, 1980,), а також інші негативні побічні ефекти, такі як гепатотоксичність (Grigorian A, 2014) і нефротоксичність (Abbas NAT, 2020). Ми припустили, що ко-імобілізація доксорубіцину з N-стеароїлетаноламіном на полімерному носії може усувати негативні побічні ефекти цього протипухлинного препарату.

З цією метою було проведено дослідження токсичної дії доксорубіцину та його комплексів на мишах. В дослідженні використовували мишей лінії Balb/c (n=5), яким вводили летальну дозу доксорубіцину (20 мг/кг ваги тіла), а також доксорубіцин, імобілізований на полімерному носії і на такому ж носії, функціоналізованому NSE. Фіксували зміну маси тіла тварин, тривалість їхнього життя та забирали кров для визначення гематологічних та біохімічних показників.

Виявлено зменшення маси тіла на 20% у групі тварин, які отримували вільний доксорубіцин, що свідчить про гостру токсичність цього протипухлинного

чинника. Показано, що доксорубіцин у дозі 20 мг/кг викликає загибель тварин уже на 25-й день після введення. На відміну від такої дії вільного доксорубіцину, нанокмпозитний комплекс – доксорубіцин-NSE – не проявляв токсичної дії на експериментальних тварин. Усі тварини ($n = 5$), які отримали смертельну дозу доксорубіцину (20 мг/кг) в складі NSE-вмісного нанокмпозиту, залишилися живими, і при цьому у них не було виявлено суттєвих морфо-фізіологічних відхилень від норми (див. результати вивчення динаміки маси тіла піддослідних тварин). Імобілізація доксорубіцину на нанорозмірному носії суттєво не впливала на прояв негативних ефектів (зниження маси, загибель) при дії доксорубіцину, навпаки, тварини гинули раніше (Рис. 24). Отже, доставка доксорубіцину носієм призводить до посилення його загальнотоксичної дії.

З метою виявлення потенційних механізмів посилення терапевтичної дії доксорубіцину, іммобілізованого на полімерному носії з кон'югованим NSE, ми провели поглиблені функціональні дослідження кровотворної системи, а також печінки, серця та нирок здорових мишей, яким вводили летальні дози вільного доксорубіцину (20 мг/кг) та іммобілізованого на полімерному носії з кон'югованим NSE або без нього. Результати досліджуваних показників крові та біохімічних показників представлені у Додатку 6, Рис. 41, Рис. 42. Дослідження гематологічного профілю крові піддослідних тварин, які отримували доксорубіцин, виявило зменшення кількості лейкоцитів (лейкопенія), а також зменшення числа лімфоцитів (лімфопенія) і збільшення числа нейтрофілів (нейтрофілоз), що спостерігалися разом із збільшенням кількості моноцитів і тромбоцитів. Тоді як застосування доксорубіцину у складі Dx-PC-NSE частково зменшувало ці несприятливі ефекти. Комплекс доксорубіцину на носії Dx-PC призводив до ще більшого підвищення рівня моноцитів, ніж вільний Dx, що може пояснювати зниження виживаності піддослідних тварин, які отримували Dx-PC, через розвиток тромбозу. Нещодавні дослідження (Bhagat A, 2022) вказують, що нейтрофіли можуть відігравати вирішальну роль у розвитку кардіотоксичності, індукованої доксорубіцином шляхом гострої інфільтрації в серце. Отже, нормалізація рівнів нейтрофілів Dx-PC-NSE, яку ми спостерігали, може пояснити відсутність

відтермінованої токсичності доксорубіцину навіть в умовах віддалених дослідженнях.

При дослідженні біохімічних показників сироватки крові тварин, яким вводили вільний доксорубіцин, виявлено достовірне дворазове підвищення активності аланін- та аспартатамінотрансфераз, зменшення активності лужної фосфатази, що вказує на гепато- та кардіотоксичність цього протипухлинного препарату (Додаток 6, Рис. 42). Вказані біохімічні показники нормалізуються у сироватці крові тварин, яким вводили доксорубіцин, іммобілізований на полімерному носії, функціоналізованому NSE.

Відсутність достовірних відмінностей змін рівнів креатиніну та сечовини в крові мишей у групі, яким вводили нанорозмірний комплекс доксорубіцину з NSE узгоджується з попередніми даними про тканино-протекторну активність NSE. Також це пов'язано зі зменшенням вибірки через загибель тварин у деяких групах через гостру токсичність антибіотику.

Нативні носії з іммобілізацією NSE та без нього не викликають негативних побічних ефектів на організм піддослідних тварин. Ми не спостерігали втрати маси тіла чи загибелі тварин протягом всього експерименту. Також не було виявлено токсичного впливу синтетичних полімерних носіїв на систему органів та тканин, оскільки не спостерігалися зміни у гематограмі та біохімічних показниках, порівняно з дією доксорубіцину (Рис. 24; Додаток 6, Рис. 41, 42).

Підсумовуючи наведене вище, ми встановили, що функціоналізація полімерної платформи за допомогою NSE для цільової доставки доксорубіцину, протипухлинного препарату з високим рівнем загальної токсичності в організмі, дозволяє значно зменшити його токсичний вплив на організм. NSE сприяє нормалізації гематологічних і біохімічних показників, покращує виживаність мишей та нормалізує їх масу. При цьому досліджувані показники морфо-функціонального стану тварин були значно порушені за дії вільного доксорубіцину так і його кон'югованої форми з полімерним носієм.

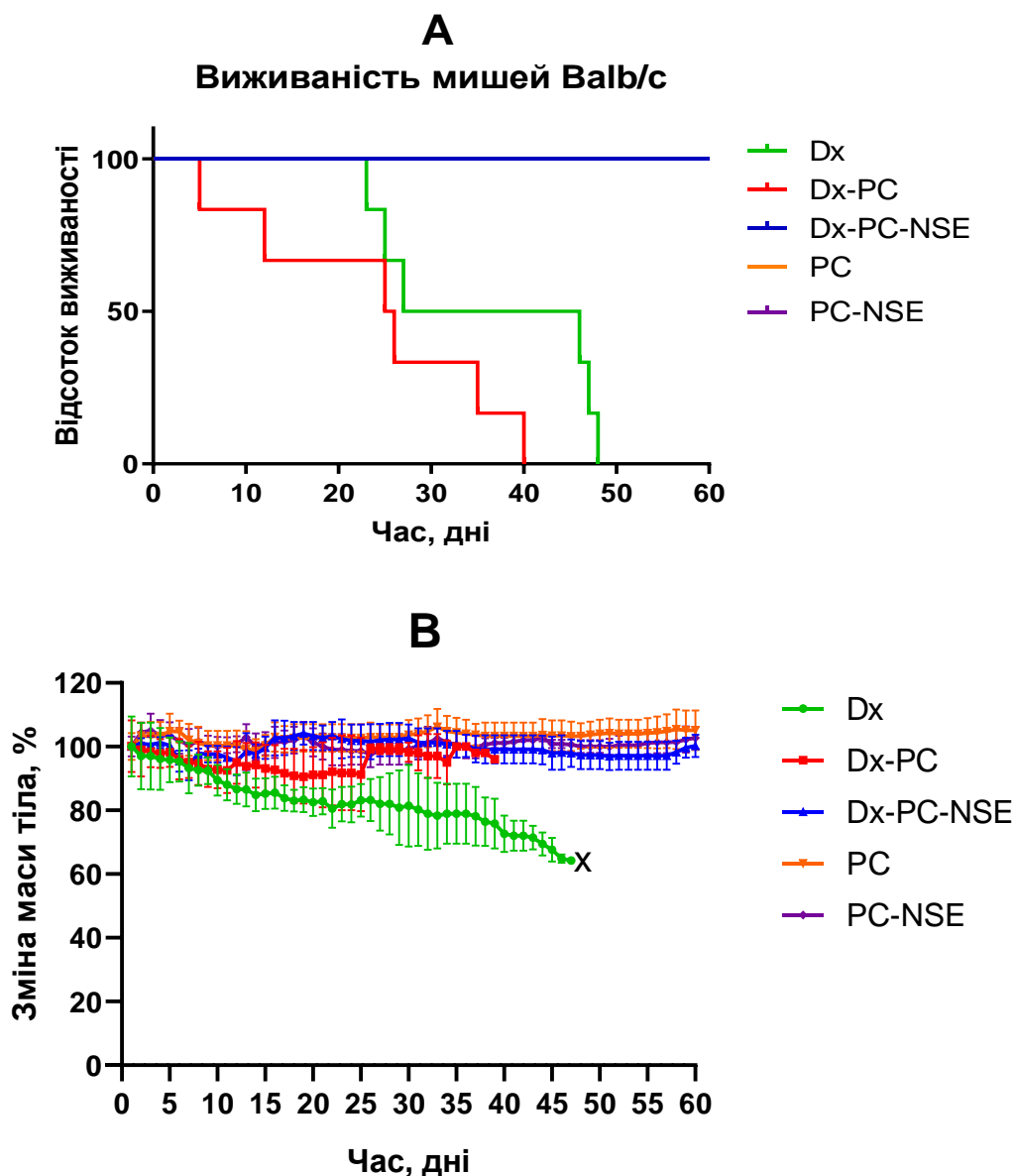


Рис. 24. Порівняння впливу доксорубіцин-NSE-нанокомпозитного комплексу із дією нативного доксорубіцину на виживаність мишей лінії Balb/c (А) та на їхню масу тіла (В) за умов введення сублетальної дози, яка рівна 20 мг/кг доксорубіцину. Х- загибель тварини.

На основі проведених досліджень можна зробити висновки:

1. Збільшення цитотоксичної активності Dx-PC-NSE *in vitro* зумовлене двома різними механізмами: посиленням проникненням у клітини-мішені завдяки підвищеній ліпофільності системи доставки препарату та посиленням вивільненням доксорубіцину у цитозолі пухлинних клітин за допомогою PC-NSE .

2. Спільна іммобілізація NSE та доксорубіцину на нанорозмірних носіях значно посилює проапоптичний ефект доксорубіцину *in vitro*.

3. Виявлено чітке дозозалежне посилення терапевтичної активності Dx щодо двох типів пухлин: лімфоми NK/Ly та лейкозу L1210 за допомогою ко-іммобілізованого N-стеароїлетаноламіну.

4. Функціоналізація полімерної платформи за допомогою NSE для цільової доставки доксорубіцину дозволяє значно зменшити його токсичний вплив на організм. NSE сприяє нормалізації гематологічних і біохімічних показників, покращує виживаність мишей та нормалізує їх масу. При цьому досліджувані показники морфо-функціонального стану тварин були значно порушені за дії вільного доксорубіцину, так і його кон'югованої форми з полімерним носієм.

Результати досліджень даного розділу опубліковано у статті:

Panchuk* R.; Skorokhyd* N.; Chumak V.; Lehka L.; Kosiakova H.; Horid'ko T.; Hudz I.; Hula N.; Riabtseva A.; Mitina N.; et al. Cannabimimetic N-Stearoylethanolamine as “Double-Edged Sword” in Anticancer Chemotherapy: Proapoptotic Effect on Tumor Cells and Suppression of Tumor Growth versus Its Bio-Protective Actions in Complex with Polymeric Carrier on General Toxicity of Doxorubicin *In Vivo*. *Pharmaceutics* 2023, 15, 835 (IF- 4.9, Q1, Pharmacology & Pharmacy).

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030835>. * – Equal contribution

3.2. Забезпечення водорозчинності та пролонгованої протипухлинної дії берберину та його похідної - 9-О-октил-берберину шляхом їх іммобілізації на носіях різної структури.

У попередньому розділі було розглянуто доставку традиційного протипухлинного препарату - доксорубіцину - за допомогою полімерного носія полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-мПЕГ, функціоналізованого N-стеароїлетаноламіном, тоді як у цьому розділі буде висвітлено особливості доставки експериментальних протипухлинних препаратів – берберину та 9-О-октил-берберину- за допомогою трьох амфіфільних полімерних носіїв із різною будовою. В ході дослідження їх

цитотоксичної дії вільних препаратів та їхніх наноконструктивів, а також потенційних молекулярних механізмів їх впливу на клітини, було визначено найбільш ефективний варіант для подальшого вивчення терапевтичного потенціалу щодо лікування мишачої меланоми B16/F10.

Біологічно активні засоби природного походження дедалі частіше застосовують як хіміотерапевтичні чинники (Cragg GM, 2016; Kinghorn AD, 2016). Перспективними кандидатами для розробки терапевтично активних похідних є алкалоїди (Lu J-J, 2012). Більшість із них проявляють бактерицидні, протизапальні та протипухлинні властивості. Окремі алкалоїди, такі як вінбластин, винорелбін, вінкристин та віндезин, уже тривалий час використовують для лікування онкологічних захворювань (Mondal A, 2019). Значну увагу привертають ізохінолінові алкалоїди, родина яких налічує понад 210 представників (Qing Z, 2017). Одним із найвідоміших є бензофенантридиновий алкалоїд сангвінарин, що володіє потужною протипухлинною активністю поряд із протизапальними, антибактерійними та знеболювальними властивостями (Singh N, 2018). Однак основним недоліком сангвінарину є його низька вибірковість, що спричиняє загибель не лише пухлинних, а й нормальних клітин, а також розвиток тяжких побічних ефектів (Singh N, 2018). Це є головною перешкодою для його подальшого використання в медицині, попри значний терапевтичний потенціал (Pallichankandy S, 2015).

Зважаючи на ці обмеження, нами було обрано іншу стратегію - посилення протипухлинної дії спорідненої природної сполуки з мінімальними побічними ефектами. Такою речовиною є ізохіноліновий алкалоїд берберин, що виявляє широкий спектр фармакологічних властивостей (Imanshahidi M, 2008; Abd El-Wahab AE, 2013; Lin K, 2013), але нетоксичний навіть у високих концентраціях, що дозволяє його використання як харчової добавки для профілактики деяких захворювань (Zeng XH, 2003). Однак низька біодоступність берберину обмежує його дослідження та клінічне застосування (Xiao D, 2018; McCarty MF, 2021; Cai Y, 2021; Yang H, 2021; Neag MA, 2018). Одним із шляхів подолання цієї проблеми є синтез напівсинтетичних похідних берберину з покращеною біодоступністю та

підвищеною протипухлинною активністю. Науковцями Інституту біології Шандунської академії наук (Китайська Народна Республіка) було синтезовано понад 20 похідних берберину, які відрізняються довжиною та хімічною природою замісника у 9-О-положенні молекули. Для наступних досліджень було обрано хімічну модифікацію берберину – 9-О-октил-берберин.

Дослідження показали, що 9-О-октил-берберин володіє підвищеною здатністю до інгібування росту ракових клітин порівняно з немодифікованим берберином. Зокрема, було виявлено, що 9-О-октил-берберин ефективно пригнічує проліферацію клітин гепатоцелюлярної карциноми (HepG2, Sk-Hep-1 та Huh-7) з IC_{50} у діапазоні від 1,2 до 2,5 мкМ, що свідчить про його потенціал як протипухлинного чинника (Chen J, 2022).

Опубліковано дані, які підтверджують кращу активність 9-О-октил-берберину щодо інгібування росту злоякісних клітин у низьких концентраціях, що підкреслює його перспективність у терапії раку (Wang R, 2020).

Нами запропоновано альтернативний підхід для підвищення терапевтичної активності берберину та 9-О-октил-берберину, а саме їх іммобілізацію на полімерних носіях різної структури для цілеспрямованої доставки до пухлинних клітин. Оскільки сам берберин і його похідне є малорозчинними у воді, іммобілізація дозволяє покращити розчинність препаратів, що зрештою підвищить біодоступність досліджуваних сполук - берберину та його модифікованих похідних та посилить ефективність дії на ракові клітини.

3.2.1. Оцінка цитотоксичної активності берберину та його нанорозмірних комплексів щодо нормальних та злоякісних клітин ссавців.

Було проведено порівняльне дослідження *in vitro* цитотоксичної активності комплексів берберину на трьох різних розгалужених полімерних носіях: 1) poly(VEP-co-GMA)-graft-mPEG; 2) poly(VEP-co-GMA)-graft-pOX; 3) poly(PEGMA-co-DMM) та його комплексів, іммобілізованих на полімерних носіях, на життєздатність Т-клітин лінії Jurkat, мишачої меланоми B16/F10 і клітин лінії HCT 116/wt карциноми прямої кишки людини. Оцінку цитотоксичної дії проводили за

допомогою методу виключення трипанового синього після 24-годинної інкубації клітин. На рис. 25 наведено результати вивчення впливу берберину та його комплексів на трьох нанорозмірних носіях на життєздатність різних типів пухлинних клітин. Показано, що берберин у вільній формі проявляє слабку цитотоксичну активність щодо досліджуваних клітинних ліній, оскільки LC_{50} для вільного берберину рівне більше 50 мкМ. Наноконкомплекс берберину (PC-PEG-Berb, PC-pEtOx-Berb, PC-PEGMA-Berb) посилюють токсичну дію берберину, спричиняючи більше зниження життєздатності клітин, проте ефективність залежить від типу полімерного носія. Комплекс PC-PEGMA-Berb виявив найсильнішу цитотоксичну дію на 24-ту годину впливу порівняно з іншими модифікаціями берберину у складі наноконкомпозиту на всіх досліджуваних клітинних лініях. Найвищу чутливість як до берберину, так і до полімерних носіїв виявили лейкозні клітини. Так, у концентрації 50 мкМ і берберин, і носії PC-PEG, PC-PEGMA, PC-pEtOx пригнічували на 40% ріст клітин лінії Jurkat T-лейкозу людини (Рис. 25). Відповідно, ефект від іммобілізації берберину на цих носіях був практично відсутній, очевидно через досить високу токсичність самих носіїв. На відміну від цього, клітини меланоми B16F10 та карциноми HCT-116 були нечутливими до дії носіїв у вільній формі – навіть у найвищій їхній концентрації, яка була еквівалентна дозі носія, необхідної для доставки 50 мкМ берберину (Рис. 25). У той же час, спостерігали виражений синергічний ефект від іммобілізації берберину на носії PC-PEGMA щодо обидвох клітинних ліній, що призводило до посилення на 30-40% дії берберину залежно від його концентрації.

Нативні полімерні носії (PC-PEG, PC-pEtOx, PC-PEGMA) не спричиняли значного зниження життєздатності клітин у концентраціях, необхідних для доставки 50 мкМ берберину, що свідчить про їхню нетоксичність.

Подальші дослідження з вивчення довготривалих впливів берберину та його комплексів проводилися протягом 72 год за допомогою МТТ-тесту (Додаток 7, Рис. 43, Рис. 44). Виявлено, що наноконкомпозит берберину на полімерному носії з прищепленим поліоксазоліном проявляє значно сильнішу дію на клітини ліній

NaCat та B16/F10, порівняно з дією вільного берберину в аналогічних концентраціях.

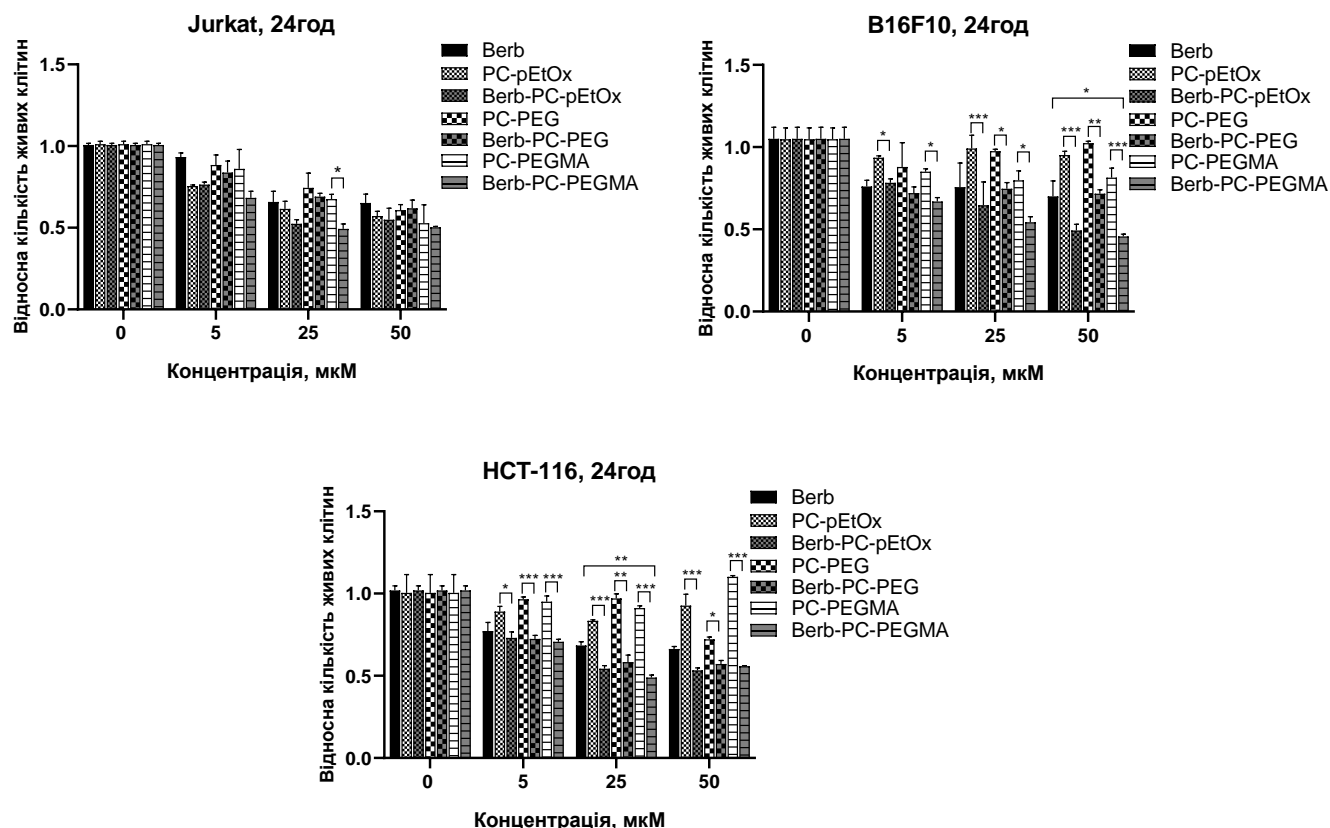


Рис. 25. Результати вивчення цитотоксичної дії берберину, його комплексів, іммобілізованих на носіях та нативних полімерних носіїв щодо Т-клітин лінії Jurkat людини, мишачої меланоми B16/F10, клітин лінії HCT116/wt карциноми прямої кишки. Тест на виключення трипанового синього, 24 год інкубації (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Для клітин лінії HCT-116/wt колоректальної карциноми людини було виявлено, що функціоналізація берберину на нанорозмірних носіях з прищепленими поліоксазоліном та ПЕГ призводить до незначного посилення його дії з дозозалежною закономірністю.

Для клітин сублінії HCT-116/p53 КО композит берберину PC-pEtOx-Berb виявляє удвічі менший LC_{50} порівняно з дією вільного берберину, що свідчить про посилення його ефекту в складі композиту. Для інших комплексів активність

берберину виявляється аналогічною до дії вільного берберину і залежить від концентрації нанокompatитів.

Усі три типи досліджуваних полімерів не виявляють вираженого цитотоксичного впливу на різні типи пухлинних та псевдонормальних клітин навіть при високих концентраціях (>50 мкМ), що підтверджує їхню потенційну безпечність для використання в подальших дослідженнях *in vivo*.

На іншій клітинній лінії – мишачій меланомі B16F10 – найсильнішу цитотоксичну дію проявив комплекс берберину, іммобілізований на полімерному носії PC-pEtOx (Додаток 7, Рис. 43).

Дослідження довготривалого впливу (72 год) трьох різних нанокompatитів берберину показало різницю у чутливості щодо різних пухлинних ліній та відмінності у цитотоксичній активності порівняно з короткотривалим впливом (24 год) (Додаток 7, Рис. 43, 44). Зокрема, найбільш чутливими до дії вільного берберину та його комплексів виявилися клітини лінії HEK 293 (20 мкМ), а найбільш стійкими – клітини лінії MCF-10A (≥ 40 мкМ). Обидві клітинні лінії є псевдонормальними та мають епітеліальне походження, однак виявляють різну чутливість до дії різних сполук. HEK 293 - це лінія клітин людини, яку часто використовують в біомедичних дослідженнях, проте ці клітини є чутливими до різних біологічно активних сполук (Liu X, 2021). Лінія MCF-10A нормальних клітин молочної залози людини широко використовується як модель у дослідженнях токсичності завдяки своїй структурній подібності до нормального епітелію молочної залози людини. Ці клітини є більш стійкими у дослідженнях цитотоксичності різних сполук (Vale N, 2020).

Таким чином, оцінка цитотоксичності берберину та його нанорозмірних комплексів щодо різних типів пухлинних та злоякісних клітинних ліній не показала селективності дії. Оскільки берберин є малорозчинним у воді, іммобілізація дозволяє покращити розчинність, зрештою біодоступність берберину та посилити ефективність дії на злоякісні клітини. На 72-гу годину дії вільного берберину та його комплексів посилення цитотоксичної активності показав препарат PC-pEtOx-Berb, і ця тенденція спостерігалася для всіх досліджуваних клітинних ліній

(Додаток 7, Рис. 44). Ці результати токсичності короткотривалих та довготривалих впливів діючих чинників дозволять визначити оптимальну модифікацію берберину на нанорозмірному носії при оцінці терапевтичного потенціалу *in vivo*.

3.2.2. Дослідження антиоксидантної активності берберину та його нанорозмірних комплексів за показниками рівня АФО та відновленого глутатіону.

Берберин володіє широким спектром біологічної активності, зокрема проявляє антиоксидантні властивості (Luo & Fan, 2011). Для з'ясування потенційних механізмів дії нанокомпозитів цього алкалоїду ми дослідили його вплив на рівень двох основних типів АФО – гідрогену пероксиду та супероксидного аніон-радикалу – у клітинах лінії НСТ 116/wt колоректальної карциноми людини. Для цього застосовували метод проточної цитофлуориметрії з використанням специфічних флуоресцентних барвників – DCFDA для визначення гідроген пероксиду та DHE для супероксидних аніон-радикалів. Глутатіон відіграє ключову роль у підтримці редокс-гомеостазу клітини, а рівень відновленого глутатіону тісно корелює зі зміною концентрації активних форм кисню. Враховуючи це, ми також визначали рівень відновленого глутатіону за допомогою проточної цитометрії. Результати впливу вільного берберину та його нанокомпозитів на трьох полімерних носіях різної природи на антиоксидантний захист та редокс-баланс представлено на Рис. 26.

Встановлено, що всі досліджувані носії (PC-PEG, PC-pEtOx, PC-PEGMA) практично не впливають на базальний рівень глутатіону та продукцію супероксидних аніон-радикалів у клітинах-мішенях. Проте аналіз змін рівня гідрогену пероксиду показав двократне зростання цього показника під впливом носія PC-PEGMA. Така власна прооксидантна активність зазначеного носія не проявлялася за дії берберину в складі нанокон'югату. Зокрема, берберин у дозі 25 мкМ спричиняв двократне підвищення рівня гідрогену пероксиду та пропорційне (на 30%) зниження рівня відновленого глутатіону. Однак не виявлено відмінностей в індукції цих показників за дії нанокон'югатів берберину. У вищій концентрації

(50 мкМ) берберин викликав ще більш значне (понад 4 рази) підвищення рівня H_2O_2 за рахунок майже повного пригнічення продукції супероксидних аніон-радикалів (див. Рис. 26). При цьому спостерігали певне підвищення рівня відновленого глутатіону, що може бути природною реакцією клітин на зовнішнє джерело оксидативного стресу. Водночас іммобілізація берберину на всіх досліджуваних носіях спричиняла зниження цього показника до рівня, нижчого за контрольний.

Аналогічний ефект спостерігали щодо продукції H_2O_2 – лише носій PC-pEtOx не впливав на цей показник, тоді як PC-PEG і PC-PEGMA спричиняли суттєве зниження рівня гідрогену пероксиду, індукованого берберином у високій концентрації (50 мкМ), на 30% для PC-PEG та на 40% для PC-PEGMA. Це може бути пояснене як власною антиоксидантною активністю носія, так і більш повільним та рівномірним проникненням берберину у клітини-мішені завдяки його контрольованому вивільненню зі складу наноконструкції. Динаміка цього процесу принципово відрізняється від дії берберину у вільній формі, який при розчиненні у ДМСО швидко проникає через плазматичну мембрану, викликаючи значні зміни у вмісті внутрішньоклітинних метаболітів.

На завершальному етапі досліджень було вивчено, наскільки корелюють виявлені зміни у редокс-статусі злоякісних клітин під впливом нанокон'югатів берберину з індукцією загибелі клітин. Для цього застосовували метод подвійного фарбування клітин APC-міченим анексином V та пропідію йодидом, а після обробки клітин карциноми лінії HCT-116 різними концентраціями діючих речовин проводили їхній аналіз за допомогою проточної цитофлуориметрії (Рис. 27; Додаток 7, рис.45). Встановлено, що у дозі 25 мкМ берберин не впливав на індукцію апоптозу, як у вільній формі, так і в складі кон'югатів з різними носіями. У концентрації 50 мкМ берберин спричиняв індукцію як апоптозу (анексин-позитивні клітини), так і некрозу (пропідію йодид-позитивні клітини). Водночас, застосування носіїв сприяло зниженню відсотка некротичних клітин при незмінній кількості апоптотичних клітин (Рис. 27). Клітинний некроз вважають небажаним явищем при дії протипухлинних препаратів, оскільки на рівні організму він може викликати низку побічних ефектів, зокрема запальні процеси. Тому вибіркоче

пригнічення некрозу під впливом полімерних носіїв є важливою терапевтичною перевагою, яка може мати значний потенціал у доклінічних дослідженнях цих сполук на тваринах. Це створює перспективи для покращення безпечності та ефективності терапії, попри відсутність вираженої різниці в дії вільного та іммобілізованого на носіях берберину *in vitro*.

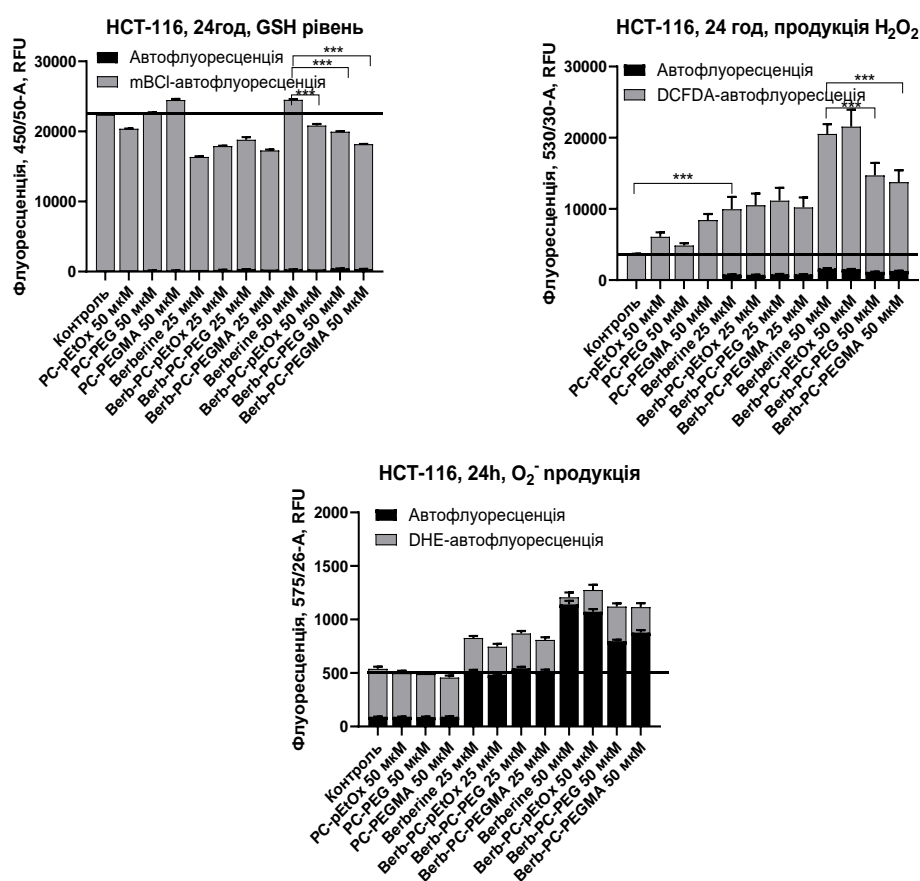


Рис. 26. Порівняння впливу берберину та його кон'югатів з різними полімерними носіями *in vitro* на продукцію АФО та зміни вмісту відновленого глутатіону в клітинах лінії НСТ-116 карциноми прямої кишки людини. Умови визначення – 24 год інкубації, фарбування монохлоробіманом, DCFDA, DHE, проточна цитофлуориметрія. Лінією позначено базальний рівень АФО чи глутатіону, чорним кольором виділено аутофлуоресценція досліджуваних сполук. *** – $P < 0.001$.

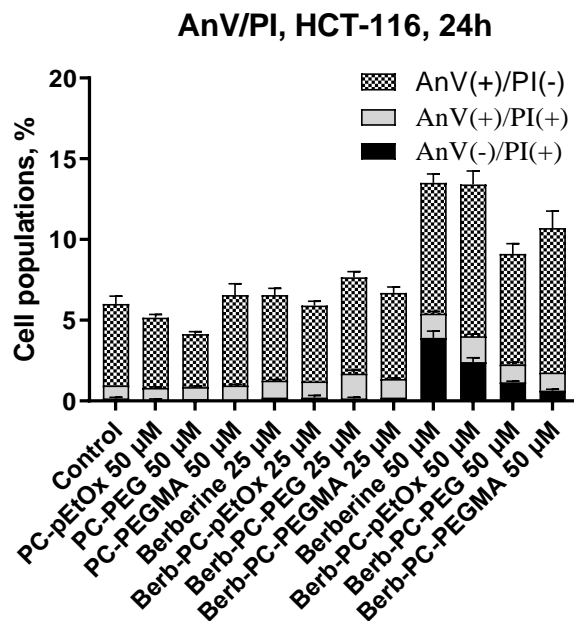


Рис. 27. Порівняння проапоптичної активності берберину та його кон'югатів на різних полімерних носіях щодо клітин лінії HCT-116 карциноми товстої кишки людини. Інкубація – 24 год, подвійне забарвлення APC-міченим анексином V та пропідію йодидом, проточна цитофлуориметрія. Кількісний аналіз розподілу клітинних популяцій.

Отримані результати підтверджують перспективність використання наноконкомплексів берберину для протипухлинної терапії. Імобілізація берберину на полімерних носіях може призводити до певного зростання його цитотоксичної активності *in vitro*, підвищуючи ефективність дії на злоякісні клітини. Цей ефект зумовлений контрольованим і тривалим вивільненням даного алкалоїда з комплексу з носіями, що, своєю чергою, може сприяти зниженню небажаних побічних ефектів берберину. Зокрема, це проявляється у зменшенні кількості некротичних клітин у популяції при збереженні його проапоптотичного потенціалу *in vitro*.

3.2.3. Підвищення розчинності та протипухлинного потенціалу 9-О-октил-берберину шляхом іммобілізації на гребенеподібних полімерних носіях.

3.2.3.1. Дослідження цитотоксичної активності похідного 9-О-октил-берберину та його наноконкомплексів на різних полімерних носіях.

Для вивчення модуляції протипухлинного потенціалу нанорозмірних носіїв алкілберберину було проведено дослідження впливу комплексів та вихідної сполуки – 9-О-октил-берберину на життєздатність різних типів пухлинних та псевдонормальних клітин з використанням барвника трипанового синього (Рис. 28) та МТТ-тесту (Додаток 7, Рис. 46).

Порівняння цитотоксичної активності 9-О-октил-берберину у складі нанокон'югатів показало дозозалежний ефект і відмінності в дії залежно від типу клітинної лінії. Алкіл-похідне берберину виявляє більш, ніж на порядок вищу активність порівняно з берберином. Зокрема, значення LC_{50} для берберину становить понад 50 мкМ, тоді як для 9-О-октил-берберину – менше 5 мкМ. Через 24 год експозиції з досліджуваними зразками наноконкомпозитів спостерігали посилення ефективності дії, незалежне від типу використаного полімерного носія. Така закономірність свідчить, що іммобілізація алкілберберину на носіях покращує його водорозчинність і приблизно вдвічі підвищує цитотоксичну активність. Нативні полімерні носії не проявляють цитотоксичної активності, що показано на рис. 28.

При вивченні довготривалих впливів (МТТ-тест, 72 год) досліджуваних наноконкомпозитів та нативного алкілпохідної виявлено залежність цитотоксичності від взятої концентрації. За нижчих концентрацій спостерігали зниження цитотоксичності препарату у складі нанокон'югатів, тоді як за вищих концентрацій, активність наноконкомпозитів PC-PEG-9-O-Berb, PC-PEtOx-9-O-Berb була співрозмірною з дією 9-О-октил-берберину. Нанорозмірний носій PC-PEGMA, навпаки, знижував активність алкіл-похідного берберину. Для псевдонормальних клітинних ліній – HaCat, MCF-10A не виявлено різниці в активності між наноконкомпозитами та вільною сполукою, тоді як на клітинах НЕК

293, MCF-10A – відзначалося навіть деяке послаблення активності (Додаток 7, Рис. 46).

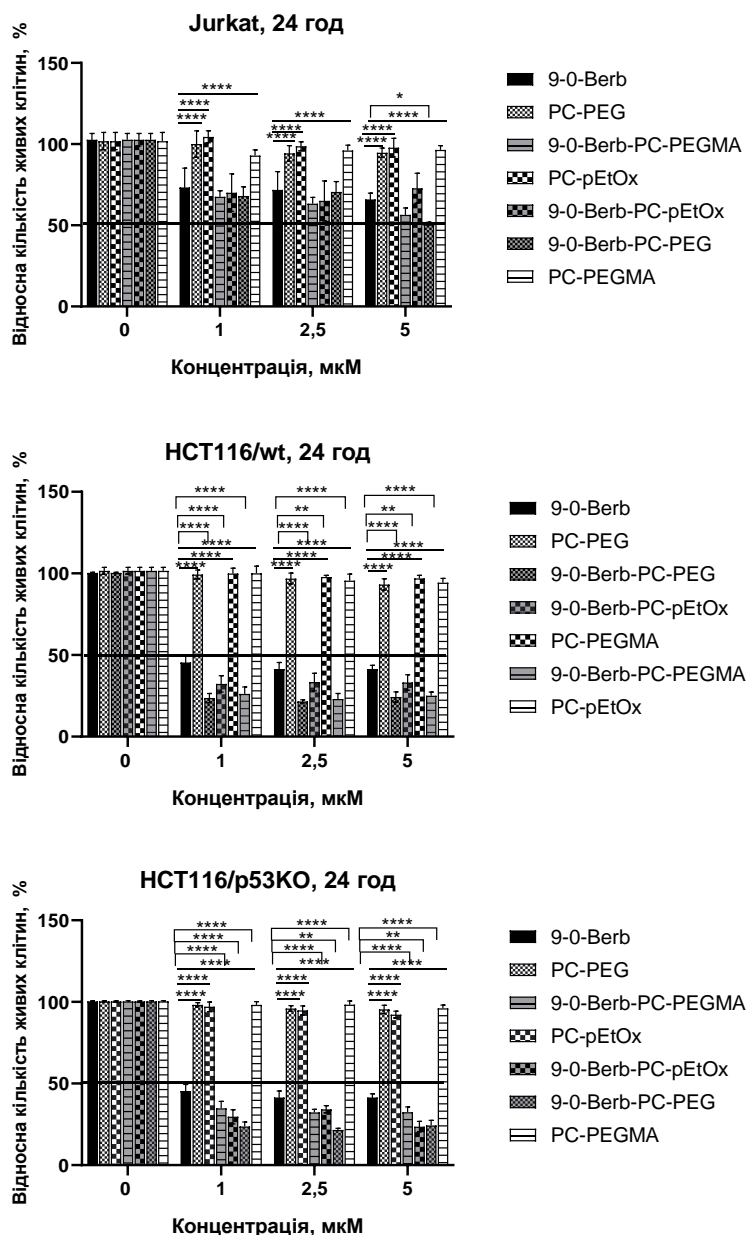


Рис. 28. Результати вивчення цитотоксичної дії 9-О-октил-берберину, його комплексів, іммобілізованих на носіях та нативних полімерних носіїв щодо Т-клітин лінії Jurkat людини, клітин лінії НСТ 116/wt карциноми прямої кишки та клітин сублінії НСТ 116/p53KO. Тест з виключення трипанового синього, 24 год інкубації (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Отже, можна стверджувати про селективність дії 9-О-октил-берберину у складі наноконструкцій щодо пухлинних та псевдонормальних клітин. Вивчення довготривалих ефектів також показало пролонговану дію полімерних носіїв, що сприяє підвищенню ефективності дії препаратів щодо злоякісних клітин.

3.2.3.2. Вивчення впливу 9-О-алкіл-похідного берберину на антиоксидантний статус клітин за показниками рівня АФО та відновленого глутатіону.

Ми виявили прямо пропорційну кореляцію між цитотоксичною активністю 9-О-берберину та його активністю щодо індукції активних форм кисню (АФО). Зокрема, зафіксовано утворення гідрогену пероксиду (H_2O_2) та супероксидних аніон-радикалів ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Берберин, маючи найнижчу активність, виявив найслабший вплив як на рівень H_2O_2 , так і на рівень $\text{O}_2^{\cdot-}$. Натомість похідне берберину індукувало масивний викид H_2O_2 , який, ймовірно, має екстра-мітохондріальне походження.

Індукована похідними берберину продукція H_2O_2 зберігалася на високому рівні та повільно знижувалася з часом, тоді як рівень $\text{O}_2^{\cdot-}$ починав зростати на пізніх часових точках, що корелювало зі збільшенням кількості загиблих клітин. Кількісне вимірювання проникнення похідних берберину в пухлинні клітини у часозалежному режимі показало зв'язок із цитотоксичністю та продукцією АФК. Для цього за допомогою FACS-аналізу було отримано спектри флуоресценції досліджуваних сполук.

Для розуміння впливу нанорозмірних носіїв на проникнення 9-О-берберину в клітини-мішені проведено часозалежний кількісний аналіз проникнення у злоякісні клітини лінії НСТ116/wt за допомогою методу проточної цитофлуориметрії. Встановлено, що найвиразніше проникнення спостерігали при довжині хвиль 536 нм (зелена флуоресценція) та 576 нм (оранжева флуоресценція). Виявлено, що всі три полімерні носії (PC-PEG, PC-pEtOx та PC-PEGMA) частково сповільнювали проникнення сполуки у клітини. У випадку PC-PEG і PC-pEtOx ефект був тимчасовим і зникав через 6 год, тоді як PC-PEGMA викликав 2,5-кратне

сповільнення проникнення у клітини, що було більш вираженим при концентрації 25 мкМ та продовжував сповільнювати проникнення сполуки у клітини-мішені на 24 год експозиції (Додаток 7, Рис. 49). Ці дані корелюють із результатами МТТ-тесту, де зразок з РС-PEGMA виявив найслабшу цитотоксичну дію. Для контролю за проникненням та цитотоксичністю використовували РС-pEtOx.

Проведено часову та дозозалежну оцінку рівнів GSH та АФО через 24 год. За дії носіїв із препаратом 9-О-октил-берберином у концентрації 10 мкМ спостерігали незначне підвищення рівня GSH (на 15 %), причому всі три носії нормалізували цей показник до рівня контрольних зразків. У той же час, за дії pEtOx спостерігали підвищення рівня пероксидів на 30 % (доза 10 мкМ). Змін у продукції супероксидних аніон-радикалів за дії наноконструкції РС-pEtOx-9-О-Berb за 24 год експозиції не виявлено (Рис. 29).

За дії комплексів з похідними берберину відзначено нормалізацію рівнів АФО, що може свідчити про активацію детоксикаційних механізмів у клітинах. На 1-у, 3-ю та 6-у години аналізу спостерігали зростання продукції АФО під впливом вільного 9-О-октил-берберину, тоді як для комплексів цього ефекту не було виявлено. РС-PEGMA викликав найвиразніше сповільнення проникнення сполуки та зменшував продукцію АФО, зокрема за дії алкіл-похідного (Додаток 7, Рис. 49, 50). Отже, РС-PEGMA виявився найменш ефективним носієм для модуляції цитотоксичності, оскільки уповільнював як процес окисдативного стресу, так і проникнення 9-О-октил-берберину.

Найкращим контролем за проникненням і продукцією АФО був РС-pEtOx. Його вплив був пролонгованим, оскільки рівень АФО продовжував зростати через 24 год, що може свідчити про тривалий ефект при терапії в організмі тварин (Wondrak GT, 2009).

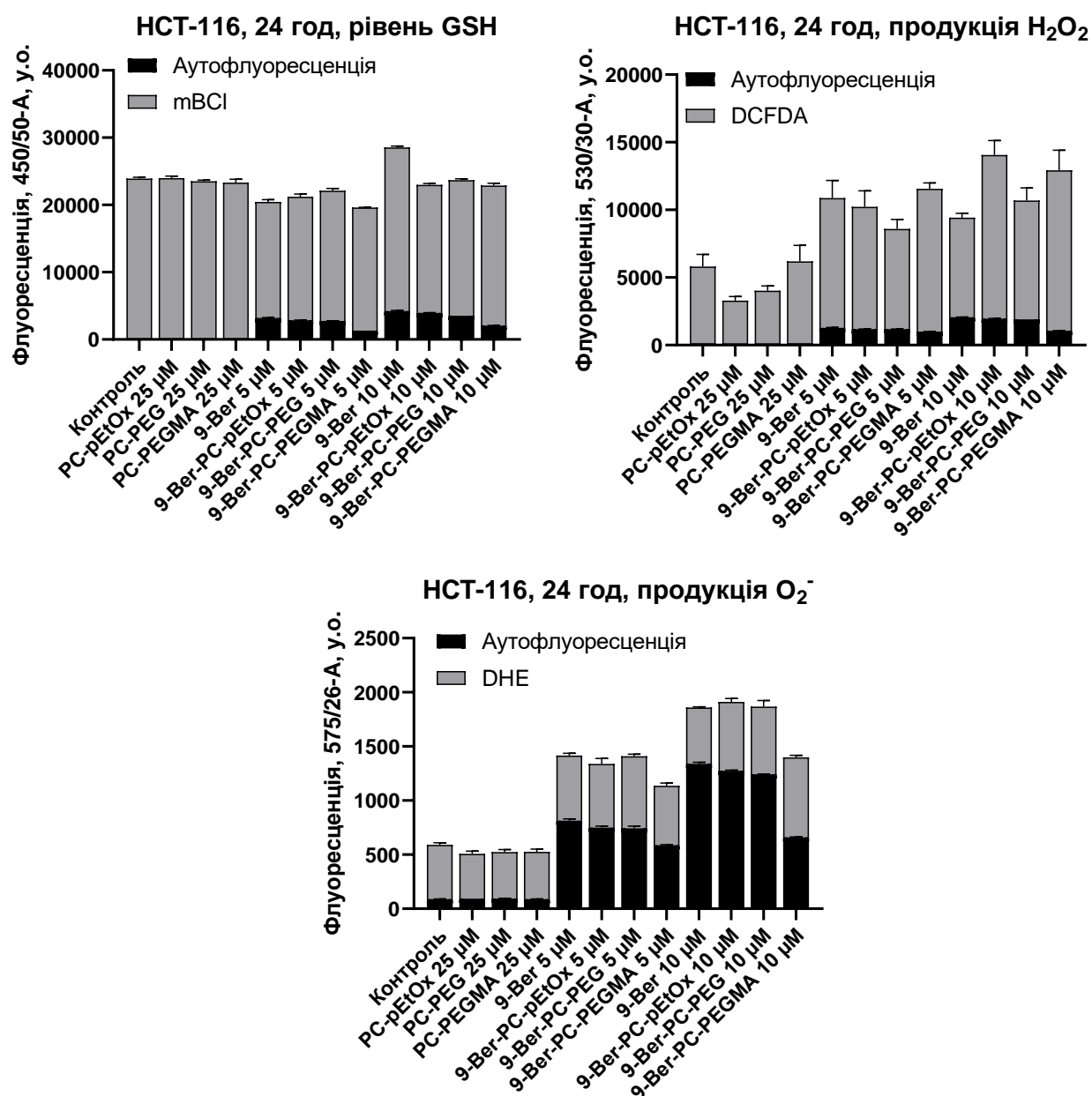


Рис. 29. Порівняння впливу 9-О-октил-берберину у вільній формі та іммобілізованого на полімерних носіях з фрагментом полі-2-оксазоліну (PC-pEtOx), ПЕГ 5000 (PC-PEG) та гліцидилметакрилату (PC-PEGMA) на продукцію гідрогену пероксиду та рівень відновленого глутатіону у клітини лінії НСТ-116 карциноми прямої кишки людини. Фарбування 2,7-дигідрофлуоресцеїндіацетатом (DCFDA) та моноклоробіманом (mBCl), проточна цитофлуориметрія, 24 год інкубації.

Результати досліджень даного розділу подано в наступних публікаціях:

Skorokhyd N.R., Panchuk R.R., Harhay Kh., Mitina N.E., Zaichenko O.S., Stoika R.S. Novel branched polymer drug carriers containing grafted side polyethylene glycol (mPEG) or polyoxazoline (pOX) chains: biocompatibility *in vivo*. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 30.

3.2.4. Дослідження терапевтичного ефекту берберину та 9-О-октил-берберину та їхніх комплексів на полімерному носію з прищепленим фрагментом поліоксазоліну щодо організму мишей з експериментальними пухлинами (мишача меланома B16/F10 дикого типу).

Отримані результати *in vitro* щодо цитотоксичної активності, а також вивчення проапоптичних та антиоксидантних механізмів дії берберину та його похідного на нанорозмірних носіях різної будови дозволили підібрати найбільш оптимальний варіант кон'югату для подальших досліджень їх протипухлинного потенціалу. Найкращі результати щодо посилення цитотоксичної дії берберину та його похідного виявила модифікація нанокомпозиту із прищепленим фрагментом полі-2-оксазоліну (PC-pEtOx). Цей тип носія забезпечував пролонгований ефект доставки досліджуваних алкалоїдів в клітини-мішені. Дані щодо продукції АФО підтверджують, що комплекс PC-pEtOx-9-O-Berb дещо знижує рівень оксидативного стресу у клітинах НСТ-116, сприяючи зменшенню токсичних ефектів на організм в цілому. Таким чином, полімерний насій PC-pEtOx у складі нанокомплексів берберину та 9-О-октил-берберину є найбільш оптимальним варіантом для обох сполук і може бути перспективним для протипухлинної терапії.

Для вивчення протипухлинної активності комплексів PC-PEtOx-Berb та PC-PEtOx-9-O-Berb *in vivo* було використано мишачу меланому B16/F10 дикого типу.

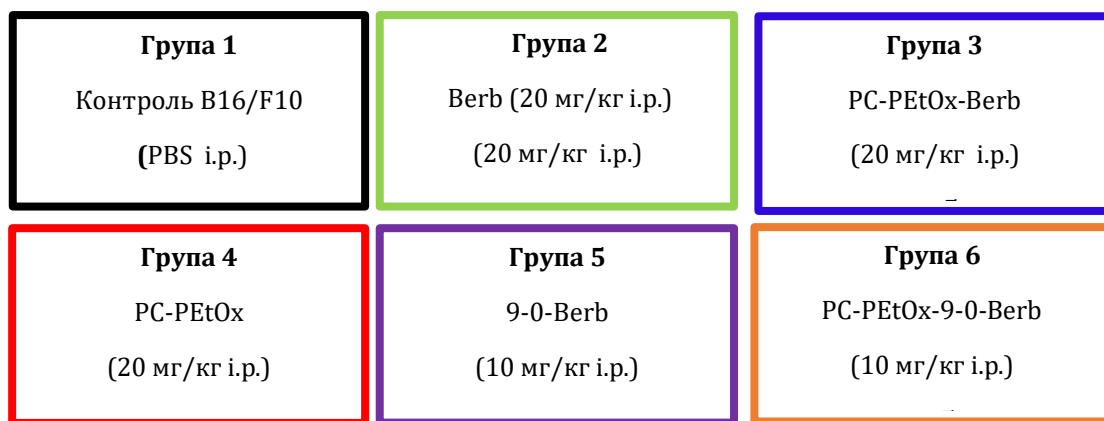


Рис. 30. Схема експерименту терапевтичного потенціалу берберину, 9-О-октил-берберину та їхніх наноконструкцій – PC-PEtOx-Berb та PC-PEtOx-9-О-Berb щодо мишачої меланоми B16/F10 (n=5).

Сформовані групи піддослідних тварин показано на Рис. 30. Під час експерименту фіксували тривалість життя, зміни розмірів пухлин та значення ключових показників гематологічного профілю крові тварин-пухлиноносіїв. На 10-й та 45-й день експерименту після останньої ін'єкції було взято кров з ретроорбітального синуса ока для оцінки ключових показників гематологічного профілю піддослідних тварин.

При хіміотерапії результативність безпосередньо пов'язана з продовженням тривалості життя, що є важливим показником ефективності лікування. Як видно на рис. 51, Додаток 7; рис. 31 та табл. 4, найкращі показники виживаності тварин показала терапія препаратами на полімерному носії PC-pEtOx. Зокрема, лікування берберином на полімерному носії PC-PEtOx-Berb сприяло збільшенню на 80 % тривалості життя тварин-пухлиноносіїв, а лікування PC-PEtOx-9-О-Berb – виявило покращення на 73 % цього показника порівняно з нелікованим контролем. Важливим критерієм ефективності терапії є частка тварин, які вижили. Найкращий результат по виживаності показала терапія алкалоїдами у складі нанокон'югатів, яка становила 60 % від загальної кількості тварин у групі (рис. 51, Додаток 7).

У мишей лінії C57/BL6 меланома B16F10 формує великі та агресивні пухлини. Дана пухлина характеризується значним збільшенням об'єму, починаючи з 10-го

дня після інокуляції. Як показано на Рис. 31; Додаток 7, рис. 52, нанорозмірні комплекси берберину та 9-О-октил-берберину спричиняли зниження об'єму пухлини порівняно з контрольною групою нелікованих тварин. Встановлено, що на 38-ий день експерименту середній об'єм пухлини у мишей-пухлиноносіїв, яким вводили PC-PEtOx-9-O-Berb, був значно меншим (282 мм³) порівняно із тваринами контрольної групи (1869 мм³) (табл.4).

Алкіл-берберин володіє терапевтичним ефектом щодо мишачої меланоми, який проявлявся у значному пригніченні росту пухлини. Натомість за терапії вільним бербериним спостерігали істотне збільшення об'єму пухлини порівняно з нелікованим контролем (Рис. 31, Додаток 7, рис. 52).

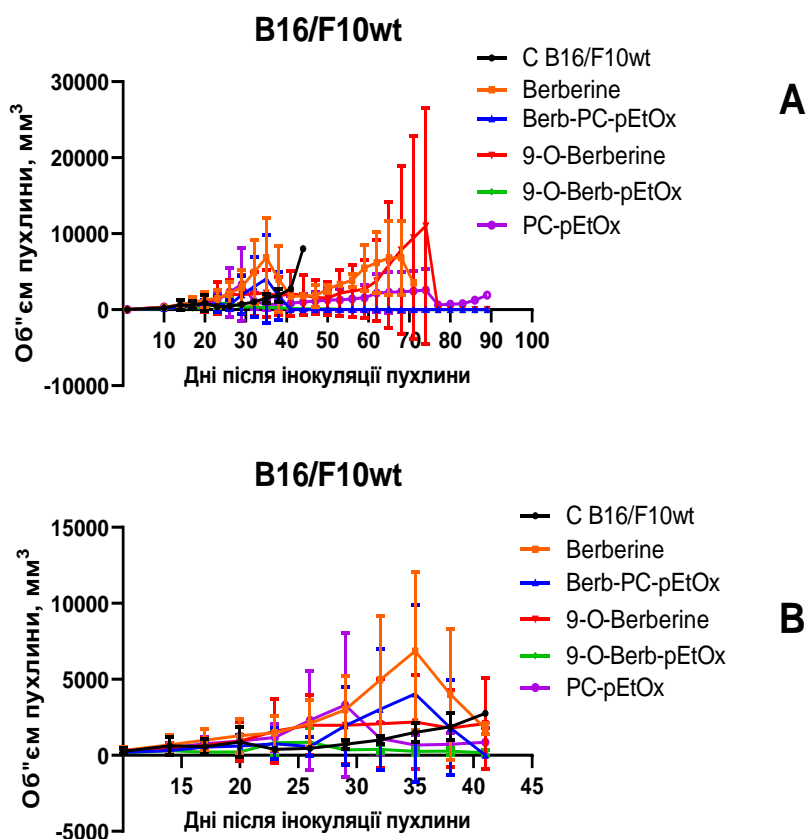


Рис. 31. Розмір пухлин у тварин-пухлиноносіїв з меланою B16/F10 wt за лікування бербериним, 9-О-октил-бербериним та їхніми комплексами на полімерному носії з прищепленим фрагментом поліоксазоліну (середнє значення для кожної групи). А-на 90-й день від початку експерименту, В – на 40-й день від початку експерименту.

Результати дослідження *in vivo* чітко демонструють, що протипухлинна активність берберину та 9-О-октил-берберину у комплексі з полімерним носієм покращується завдяки збільшенню водорозчинності та біодоступності цих біологічно активних сполук. У випадку алкіл-берберину, який має сильнішу токсичну дію як на пухлинні клітини, так і на здорові клітини та тканини, використання носія сприяє зменшенню негативних побічних ефектів при збереженні високої протипухлинної активності.

Таблиця. 4. Тривалість життя у мишей-пухлиноносіїв та розміри пухлини на 38-й день у мишей-пухлиноносіїв за хіміотерапії мишачої меланоми B16F10 wt берберином, 9-О-октил-берберином та їхніми комплексами на полімерному носію з прищепленим фрагментом полі-2- оксазоліну

Показники	Контроль B16/F10 wt n=10	PC- pEtOx n=4	Berberine n=7	Berb-PC- pEtOx n=5	9-0- Berb n=5	9-0- Berb- PC- pEtOx n=5
Тривалість життя (дні)	49	58	50	88	47	84
Продовження тривалості життя щодо нелікованого контролю,100%	100	120	103	180	97	173
Частка тварин, які вижили на 120 день	0/10	0/4	0/7	3/5	0/5	3/5
Середній розмір пухлини в кінці хіміотерапії (38 день), мм ³	1869	718	2099	1808	1800	282

Нами досліджено гематологічний профіль тварин досліджуваних груп у часовій розгортці. Забір крові для аналізу здійснювали через 10 та 45 діб після останньої ін'єкції досліджуваними препаратами. Гематологічний профіль у піддослідних мишей включав підрахунок рівня гемоглобіну, еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, відносного вмісту нейтрофілів (%), лімфоцитів (%) і моноцитів (%). На Рис. 53, Додаток 7, представлено результати дослідження змін

показників гематологічного профілю на 45-ту добу експерименту. Виявлено значні зміни у досліджуваних показниках у групі з лікуванням берберином. Зокрема, спостерігали розвиток лейкоцитозу (збільшення кількості білих кров'яних клітин на 29% порівняно з контрольною групою), еритропенії (зниження кількості еритроцитів на 32%), а також збільшення кількості тромбоцитів (на 34 % порівняно з контрольною групою інтактних тварин). У крові тварин цієї групи зафіксовано зміни у лейкограмі, які показали нейтрофіліоз (збільшення частки на 62% порівняно з групою здорових тварин), лімфоцитопенію (зменшення частки на 21% порівняно з групою здорових тварин). Також відзначено зменшення рівня гемоглобіну та збільшення кількості тромбоцитів на 34 % у зразках крові тварин-пухлиноносіїв групи берберину порівняно з контрольною групою інтактних тварин. Цей алкалоїд не проявляв терапевтичної активності щодо меланому B16F10, оскільки не інгібував ріст пухлини, що проявляється у відсутності порушення показників крові. Раніше нами досліджено зміни ключових показників крові у тварин з привитою меланомою B16/F10wt. Встановлено, що інтенсивний пухлинний ріст призводить до лейкоцитозу, еритропенії, збільшення частки нейтрофілів та зменшенню частки лімфоцитів та моноцитів (Panchuk R, 2017).

Відсутність достовірних відмінностей у рівнях еритроцитів, тромбоцитів, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів у групі контролю меланому B16/F10 свідчить про сповільнене прогресування пухлинного росту у більшості тварин, що вижили станом на 45-у добу експерименту. Це також може бути пов'язано зі зменшенням вибірки через загибель тварин у деяких групах внаслідок прогресування пухлинного росту, що ускладнює виявлення можливих відмінностей. Єдині зміни у показниках крові у групі з нелікованим контролем виявлено у достовірному зростанні відносної кількості моноцитів у 10 разів порівняно з групою інтактних тварин. Відносна кількість моноцитів зазнала змін у тварин всіх груп, яка проявлялася у зростанні цього показника порівняно з здоровим контролем. Найбільша різниця у збільшенні частки моноцитів зафіксовано у групі берберину – у 4,5 раза порівняно з групою здорових тварин.

Зростання вказаного показника може свідчити про розвиток запальних процесів, які супроводжують інтенсивний пухлинний ріст (Baniyash M, 2014).

Пухлинний ріст у тварин-пухлиноносіїв супроводжувався зниженням рівня гемоглобіну у всіх групах тварин порівняно із групою інактивних тварин. Виняток становила група з лікуванням PC-PEtOx-9-O-Berb, де не зафіксовано змін, що пояснюється нормалізацією стану еритропоетичної системи крові під впливом цього препарату.

На рис. 54, Додаток 7 показано зміни гематологічного профілю на 75-ту добу експерименту. Встановлено, що у більшості тварин піддослідних груп, окрім групи PC-PEtOx, не виявлено впливу терапії препаратами нанокон'югатів берберину та 9-О-октил-берберину на віддаленому часовому проміжку. Нормалізація показників крові узгоджується з показником виживаності піддослідних тварин і підтверджує терапевтичний потенціал досліджуваних нанокон'югатів. Для групи з лікуванням PC-pEtOx спостерігали значні зміни у гематологічних показниках – збільшення на 40 % кількості лейкоцитів, зменшення на 18 % кількості еритроцитів, зменшення на 21 % рівня гемоглобіну, збільшення на 75 % кількості тромбоцитів та порушення лейкограми, яке супроводжувалося змінами у співвідношенні клітин відносно загальної кількості лейкоцитів – зростання у 3,3 рази частки нейтрофілів, зменшення на 46% частки лімфоцитів та зростання у 4 рази частки моноцитів. Такі зміни у групі з терапією полімерним носієм PC-pEtOx вказують на загострення розвитку меланоми, що у підсумку призвело до загибелі тварин цієї групи. Ця тенденція до змін ключових показників гематологічного профілю порівняно з інактивним контролем узгоджується з даними про динаміку росту пухлин у тварин із зазначених груп та є передвісником подальшої загибелі тварин у даних групах. Гематологічний профіль тварин відповідає динаміці росту пухлин та чітко відображає ефективність терапевтичної дії досліджуваних препаратів.

У підсумку, експерименти *in vivo* на мишачій меланомі B16F10 переконливо показали високу протипухлинну активність нанорозмірних комплексів берберину і 9-О-октил-берберину. Досліджувані нанокон'югати вдвічі продовжували

тривалість життя дослідних тварин, при цьому не виявляючи суттєвого гематотоксичного ефекту.

Таким чином, отримані результати *in vitro* та *in vivo* підтверджують ефективність застосування комплексів берберину і алкілберберину щодо терапії мишачої меланоми. Це вказує на доцільність подальших доклінічних досліджень даних нанорозмірних комплексів алкалоїдів.

На основі отриманих дослідження протипухлинного потенціалу берберину та 9-О-октил-берберину сформовано наступні висновки:

1. У дослідженні вперше доведено ефективність іммобілізації берберину та 9-О-октил-берберину на трьох різних типах полімерних носіїв з гетероатомними бічними ланцюгами, що забезпечують його водорозчинність та біодеградабельність.

2. Дослідження життєздатності клітин *in vitro* продемонструвало, що використані наноконізати берберину та його похідної на полімерних носіях виявляють більш високу токсичність щодо пухлинних клітин, ніж сполуки у вільній формі. Ступінь зниження життєздатності клітин під впливом наноконізатів берберину (PC-PEG-Berb, PC-pEtOx-Berb, PC-PEGMA-Berb) залежить від типу полімерного носія. Водночас, нативні полімерні носії (PC-PEG, PC-pEtOx, PC-PEGMA) у вільній формі не викликають значного зниження життєздатності клітин у концентраціях, необхідних для доставки 50 мкМ алкалоїдів, що свідчить про їхню біосумісність.

3. Використання наноконізатів значно покращує розчинність водонерозчинних досліджуваних алкалоїдів, підвищує їхню біодоступність і модулює терапевтичний ефект щодо лікування меланоми B16F10 у мишей. Терапія наноконізатами сполук на полі(2)-оксазоліновому носії призводила до одужання 60% мишей з меланою та нормалізації функцій життєво важливих органів.

3.3. Порівняльне дослідження токсичності нових полімерних носіїв на основі VEP-co-GMA та PEGMA-co-DMM *in vitro* та *in vivo*.

Розробка та застосування ефективних біосумісних наноплатформ для доставки ліків є ключовим завданням сучасної фармакології та медицини. Вони дозволяють посилити дію протипухлинних препаратів, знизити їх токсичність, а також подолати набуту резистентність пухлин до хіміотерапії та зменшити побічні ефекти по відношенню до нормальних клітин організму. Для цільової доставки протипухлинних препаратів запропоновано три типи полімерних носіїв на основі VEP-co-GMA (2-трет-бутилперокси-5-метил-1-гексан-3-іну) з прищепленими мПЕГ та полі-2-оксазоліном, а також полімер зовсім іншої будови (PEGMA-co-DMM), що містить мономер – диметилмалеат (DMM) та макромер полі(етиленгліколь)-метилетиловий ефір-метакрилат (ПЕГМА) з молекулярною масою 500 Da. Було проведено порівняльне дослідження розгалужених полімерних носіїв: 1) poly(VEP-co-GMA)-graft-mPEG; 2) poly(VEP-co-GMA)-graft-pOX; 3) poly(PEGMA-co-DMM), *in vitro* та *in vivo*. Дані полімери синтезовані за допомогою полімер-аналогічних перетворень та ко-полімеризації макромеру PEGMA. Різний склад та підходи до синтезу забезпечують контроль структурних та молекулярно-масових характеристик нових розгалужених кополімерів, їх міцелізаційної здатності та колоїдно-хімічних властивостей, що впливають на біосумісність. Їхні фізико-хімічні властивості вивчено нашими партнерами з Національного Університету «Львівська політехніка» на кафедрі органічної хімії під керівництвом професора О. Заїченка. Синтез і фізико-хімічні характеристики використаних полімерних носіїв наведено в Додатку 4.

Ми поставили за мету оцінити біосумісність трьох нових полімерів із різною структурою та молекулярною масою для потенційного застосування нанорозмірних носіїв для доставки ліків. Було проаналізовано морфологію, здатність до навантаження ліками, цитосумісність та протипухлинну активність. В даній роботі використано системи доставки ліків на основі полімерних носіїв, де навантаженість лікарськими засобами становить 3%. Оскільки частка полімера є досить високою, він може виявляти певну цитотоксичну активність щодо різних

типів клітин (злоякісних та псевдонормальних) *in vitro*, а також впливати на організм в цілому. Тому вибір носія для лікарського засобу має вирішальне значення для його протипухлинного потенціалу та ефективності доставки лікарського засобу.

Досліджувані типи полімерних носіїв мають розгалужену будову та гребенеподібну форму та утворюють міцели в розчині. Наявність у структурі гребенеподібних-кополімерів карболанцюгових блоків зумовлює їхню поверхневу активність і здатність утворювати полімерні міцели з відносно високим числом агрегації. При цьому природа блоків суттєво впливає на колоїдно-хімічні характеристики кополімерів.

Два полімери, а саме PC-PEG та PC-pEtOx, мають однакову основу (2-трет-бутилперокси-5-метил-1-гексан-3-ін) і подібну молекулярну масу (240 кДа (PC-PEG) та 350 кДа (PC-pEtOx)). Третій полімер, PC-PEGMA, суттєво відрізняється за молекулярною масою, яка становить 50 кДа. Згідно з аналізом динамічного розсіювання світла (DLS), розміри полімерних міцел також відрізнялися. Найменший розмір спостерігався у міцел PC-PEG (50 нм) (Рис.6). Розмір полімерних частинок впливає на їхнє проникнення в біологічні системи, а також визначає можливі негативні побічні ефекти. Важливу роль у виявленні біологічної активності полімерів може відігравати прищеплена частина. Якщо полімер містить багатоатомний спирт, такий як поліетиленгліколь (ПЕГ) чи поліоксазолін (pEtOx), то такі системи завдяки наявності ОН-груп повинні краще розщеплюватися як на рівні клітин, так і в організмі загалом. Це сприяє їх кращому виведенню з організму та підвищеній біосумісності.

3.3.1. Дослідження цитотоксичної активності наноносіїв на основі VER-co-GMA та PEGMA-co-DMM щодо різних типів пухлинних та псевдонормальних клітин *in vitro*.

У дослідженні використовували наступні лінії злоякісних клітин: HCT116 wt (колоректальна карцинома людини), B16/F10 wt (меланома миші), Jurkat (гострий

Т-лейкоз людини) та псевдонормальні клітини лінії HaCat (кератиноцити людини) і HEK 293 (клітини ембріональної нирки людини).

Вивчення цитотоксичної активності полімерних носіїв (PC) на життєздатність різних типів пухлинних та псевдонормальних клітин *in vitro* досліджували за допомогою барвника трипанового синього (24 год) та МТТ-тесту (72 год).

Згідно з результатами дослідження цитотоксичності на 72 год, жоден із досліджуваних полімерів не виявив помітної токсичності щодо пухлинних клітинних ліній HCT-116/wt та HCT-116/p53 KO ($LC_{50} > 100$ мкМ). На псевдонормальній клітинній лінії (HEK 293) найвищу цитотоксичність порівняно з іншими ко-полімерами проявив полімер PEGMA-co-DMM, оскільки мав найнижче значення LC_{50} рівне 46,05 мкМ. Токсичність усіх сполук щодо клітинної лінії HaCat є мінімальною ($LC_{50} > 100$ мкМ). Ці результати продемонстрували слабку токсичну дію ко-полімерів на різні типи клітинних ліній на 72-ту годину впливу на різні типи клітинних ліній (Табл. 5, Рис. 55, Додаток 8).

Таблиця 5. Значення LC_{50} PC-PEG, PC- pEtOx та PC- PEGMA щодо пухлинних та псевдонормальних клітинних ліній ссавців *in vitro*. МТТ-тест, 72 год інкубації

Зразки	Значення LC_{50} сполук для клітинної лінії, мкМ ($M \pm SD$)			
	HCT-116/wt	HCT-116/p53 KO	HEK 293	HaCat
PC-PEG	>100	>100	$51,4 \pm 0,26$	>100
PC-pEtOx	>100	>100	$84,4 \pm 0,24$	>100
PC-PEGMA	>100	>100	$46,0 \pm 0,42$	> 100

Отримані дані щодо цитотоксичної дії взятих нанорозмірних носіїв на злоякісні клітинні лінії – на Т-клітини лінії Jurkat лейкозу людини та клітини лінії B16F10 мишачої меланоми, після 24 год інкубації не показали значного токсичного впливу навіть за великих концентрацій (75 мкМ). Це свідчить про відсутність протипухлинного ефекту цих полімерів (Додаток 8, Рис. 55).

3.3.2. Оцінка потенційних побічних ефектів нових полімерних носіїв на основі VEP-co-GMA та PEGMA-co-DMM *in vivo* шляхом аналізу морфофізіологічних та біохімічних показників у мишей лінії C57/BL6

Ми отримали попередні дані щодо впливу полімерів на клітинному рівні, однак важливо також оцінити їхню дію на організм в цілому. Незважаючи на численні переваги, питання біосумісності та біорозкладності багатофункціональних наноматеріалів залишаються одними з головних перешкод для їх широкого застосування. Особливо важливо дослідити вплив полімерних наноносіїв на гематологічний та біохімічний профіль тварин, оскільки зміни цих параметрів можуть свідчити про системну токсичну дію, що може спричинити серйозні порушення у функціонуванні організму.

Дослідження *in vivo* були проведено за схвалення Комісії з питань біоетики Інституту біології клітини НАН України (протокол № 2/2024 від 19.03.2024 р.).

Основною метою даного дослідження було оцінити загальну токсичність застосованих полімерів на кровотворну систему, печінку та нирки лабораторних тварин (мишей) за умов тривалого введення. Токсичну дію та кумулятивні властивості полімерних носіїв оцінювали у порівнянні з токсичністю доксорубіцину на мишах (Noha A, 2020). Розрахунок кількості носія було зроблено з розрахунку 3% навантаження протипухлинним препаратом і дози препарату 2 мг/кг. Це максимальна кількість носія, яка може бути введена тваринам.

Тваринам доочередно вводили доксорубіцин у дозі 2 мг/кг та розчини трьох полімерних носіїв у дозі 66,4 мг/кг у вигляді 10 ін'єкцій через 72 год (Рис. 32).

Під час експерименту фіксували зміни маси тіла та тривалість життя тварин. Біосумісність полімерних носіїв у мишей-самок лінії C57/BL6 оцінювали з урахуванням гематологічних та біохімічних показників крові у досліджуваних тварин. Зразки крові відбирали на 5-у та 45-у доби після останньої ін'єкції.

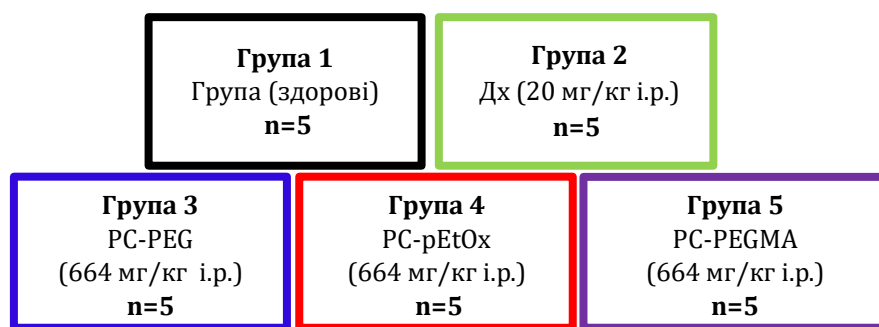


Рис. 32. Схема експерименту з оцінки токсичності та біосумісності полімерних носіїв на основі VER-co-GMA та PEGMA-co-DMM.

У мишей, яким вводили досліджувані наноматеріали, не виявлено загибелі або значних змін у масі тіла. Загальна доза 664 мг/кг цих матеріалів (кількість полімеру, що містить 20 мг/кг іммобілізованого препарату) не була летальною для досліджуваних тварин. Однак, коли миші отримували сублетальну дозу (20 мг/кг) доксорубіцину (Dx), спостерігали значне зменшення маси тіла порівняно зі здоровими тваринами і 60% мишей загинули під час експерименту (Рис. 57, Додаток 8).

Також були виявлені зміни у формулі крові мишей, які отримували сублетальну дозу Dx (20 мг/кг), що призводило до зниження рівня лейкоцитів у крові. Це призводило до зниження кількості лейкоцитів, нейтрофільозу та лімфоцитопенії з одночасним підвищенням рівня моноцитів. Крім того, у групі тварин, які отримували Dx, було зафіксовано зниження рівня гемоглобіну та еритроцитів.

На відміну від дії доксорубіцину, полімерні наноносії не мали негативного впливу на гематопоетичну систему організму мишей на 30-у добу експерименту. (Рис. 58, Додаток 8).

Більш віддалені ефекти впливу наноносіїв (PC-PEG, PC-pEtOX, PC-PEGMA) та доксорубіцину (Dx) на гематопоетичну систему здорових тварин через 70 діб після введення дози 20 мг/кг, порівняно з контрольною групою представлені на Рис. 59, Додаток 8.

Рівень лейкоцитів знижувався під впливом доксорубіцину ($p < 0,01$) у порівнянні з контрольною групою, тоді як вплив наноносіїв не мав статистично значущих змін. Кількість еритроцитів мала тенденцію до зниження після введення доксорубіцину, тоді як наноносії не мали значного впливу. Рівень гемоглобіну залишався стабільним у всіх групах, включаючи групу з доксорубіцином, що відрізняло результати на 70-у добу від даних на 30-у добу.

Щодо тромбоцитів, PC-PEGMA спричиняв підвищення їх рівня, тоді як у групі доксорубіцину кількість тромбоцитів була на рівні контролю. У лейкоцитарній формулі частка нейтрофілів зростала після введення доксорубіцину, тоді як наноносії виявили мінімальний вплив. Частка лімфоцитів знижувалася в групі доксорубіцину, але ця зміна не була статистично значущою. Частка моноцитів залишалася стабільною у всіх групах, без суттєвих змін.

Загалом, отримані дані свідчать про те, що наноносії мають мінімальний вплив на гематопоетичну систему здорових тварин через 70 діб після введення. Доксорубіцин продовжував виявляти негативний вплив, особливо на рівень лейкоцитів, еритроцитів та співвідношення нейтрофілів, тоді як вплив на інші показники був менш вираженим у порівнянні з раннім періодом дослідження (Рис. 58, Додаток 8).

Отримано дані про вплив наноносіїв PC-PEG, PC-pEtOx та PC-PEGMA на біохімічні показники функціонального стану печінки та нирок у здорових тварин на 30-у та 70-у доби після введення дози 20 мг/кг (Додаток 8, Рис. 60, 61, 62).

Рівень АсАТ залишався стабільним у всіх досліджуваних групах, без суттєвих змін через 30 та 70 діб, порівняно з контрольною групою.

У мишей, яким вводили PC-pEtOx, спостерігалось зниження активності лужної фосфатази на 70-ту добу порівняно з 30-ю добою. Інші досліджувані біохімічні показники змін не зазнали. Найбільші зміни у показниках спостерігалися у групі мишей, яким вводили PC-PEG. АлАТ виявила значне підвищення через 30 днів після введення PC-PEG, але через 70 діб рівень повертався до контрольного значення, що свідчить про тимчасовий вплив наноносія на функцію печінки. У групі, якій вводили PC-PEG, виявлено підвищення активності АлАТ у 4,14 раза на

30-у добу експерименту і в 2,96 рази на 70-у добу порівняно з контролем. Сечовина в групі PC-PEG показала тенденцію до зниження через 70 діб після введення, що може свідчити про зміни у функціонуванні нирок або метаболізмі нітрогену. Дані на графіку демонструють, що рівень креатиніну в групі PC-PEG суттєво знижується протягом експерименту. Через 70 діб рівень залишався заниженим, хоча спостерігалось часткове відновлення, але значення все ще були статистично нижчими за контроль. Ця динаміка може вказувати на те, що введення PC-PEG впливає на функцію нирок або метаболізм білків, що призвело до зниження рівня креатиніну.

Загалом, отримані результати свідчать про тимчасові зміни в біохімічних показниках, зокрема в активності печінкових ензимів і функції нирок, під впливом наноносіїв. Однак більшість показників нормалізувалися через 70 діб, що може свідчити про адаптивний характер цих змін.

У висновках до розділу можна зазначити наступне:

1. Усі три типи досліджуваних полімерів не проявляють вираженого цитотоксичного впливу на різні типи пухлинних і псевдонормальних клітин навіть у надвисоких концентраціях (>50 мкМ). Це свідчить про їхню безпечність і потенційну здатність до використання *in vivo*.

2. Біосумісність носіїв *in vivo* визначали шляхом їх доочеревиного введення мишам у дозі, еквівалентній 20 мг/кг протипухлинного препарату, який може бути навантажено на цей носій. При цьому не було виявлено загибелі тварин та суттєвих змін у масі їх тіла як на 30-у, так і на 70-у добу після введення носіїв.

3. Дія досліджуваних полімерних носіїв характеризується значно менш вираженими негативними побічними ефектами на гематопоетичну систему організму та систему органів мишей у порівнянні з дією доксорубіцину, який у дозі 20 мг/кг призводив до загибелі 60% тварин внаслідок анемії, лейкопенії з одночасним нейтрофілозом та моноцитозом, а також проявляв кардіо- та гепатотоксичність.

4. Найкращі показники біосумісності виявив полімерний носій VEP-co-GMA, функціоналізований полі-2-оксазоліном, який і буде використаний в подальших

дослідженнях як платформа для доставки експериментальних протипухлинних препаратів.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:
Skorokhyd N.R., Panchuk R.R., Harhay Kh., Mitina N.E. , Zaichenko O.S., Stoika R.S.
Novel branched polymer drug carriers containing grafted side polyethylene glycol (mPEG) or polyoxazoline (pOX) chains: biocompatibility *in vivo*. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 30.

3.4. Дослідження протипухлинної активності нових наночастинок на основі оксиду феруму (III), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном) як систем для доставки лікарських засобів.

Для створення багатфункціональних платформ, окрім використання різних полімерів, широко застосовують і неорганічні наночастинок. Вони здатні інкапсулювати як гідрофільні, так і гідрофобні лікарські речовини, забезпечувати стабільність дії та контрольоване вивільнення ліків у місці призначення. Однією з переваг наночастинок є простота їх масштабного синтезу та стерилізації, а також нижча вартість у порівнянні з полімерними наноматеріалами. Досліджувані магніто- та термочутливі тверді ліпідні частинки (mag.SLPs) були отримані в присутності наночастинок оксиду феруму (ІО-ОА), покритих олеїною кислотою, з 1-тетрадеканолам та полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном) як ліпідними та стабілізуючими поверхнево-активними речовинами, відповідно. Частинки з гідродинамічним розміром ~850 нм демонстрували тепловіддачу під дією змінного магнітного поля. Дані наносистеми були розроблені в рамках співпраці з групою доктора Даніеля Горака, Інститут макромолекулярної хімії Чеської АН та надані нам за угодами про науково-технічну співпрацю. Фізико-хімічні характеристики та спосіб утворення різних модифікацій наночастинок на основі оксиду феруму описано у розділі 2 та подано в додатку 5.

3.4.1. Оцінка цитотоксичної дії *in vitro* мінеральних наночастинок оксиду заліза SLPs (mag.SLPs) щодо різних типів пухлинних клітин

На першому етапі дослідження було проведено аналіз цитотоксичної дії магнітних частинок mag.SLPs, як альтернативи цитотоксичним протипухлинним препаратам на різні лінії злоякісних клітин у порівнянні з активністю доксорубіцину. Протираковий ефект mag.SLPs було порівняно з ефектом доксорубіцину (Dx), як наріжного каменю і золотого стандарту в протираковій хіміотерапії (Lippens RJ, 1998; Minotti G, 2004; Zhao M, 2017). Для оцінки впливу цих магнітних частинок на ріст і виживання використовували чотири типи суспензійних клітинних ліній, а саме: Т-клітини лінії Jurkat лейкозу людини, клітини лінії HL-60/wt мієлоїдного лейкозу людини та медикаментозно-резистентні сублінії: лейкозу HL-60/adr (з надмірною експресією MRP1 = ABCC1)) і HL-60/vinc (з надмірною експресією Р-глікопротеїну = ABCB1), що мають фенотип множинної резистентності, індукованої селекцією щодо доксорубіцину (Dx) і вінкристину, відповідно. Оцінку цитотоксичної дії досліджуваних наноматеріалів проводили за допомогою тесту на виключення трипанового синього для з'ясування короткотривалих та довготривалих ефектів впливу (Рис. 33).

Mag.SLPs продемонстрували чітку дозозалежну цитотоксичність. Встановлено значну залежність від тривалості впливу (24 год проти 72 год), яка спостерігалася лише для клітин HL-60/adr (Рис. 33 D), де цитотоксичність на 72 год була нижчою, ніж на 24 год дії наночастинок. Це, ймовірно, зумовлено відновленням проліферації клітин при більш тривалій експозиції з наночастинками. Проте точна причина вищої стійкості Dx-резистентних клітин сублінії HL-60/adr до цитотоксичної активності магнітних частинок на 72-у годину після обробки клітин порівняно з 24 годиною потребує подальшого дослідження. IC_{50} для mag.SLP, які інкубувалися з клітинами протягом 24 годин, становила 3,8, 2,7, 1,9 та 2,3 мкг/мл для клітин Jurkat, HL-60/wt, HL-60/adr та HL-60/vinc, відповідно (табл. 6). Експозиція магнітних наночастинок (mag.SLPs) з клітинами ліній Jurkat, HL-60/wt, та їх резистентних субліній (HL-60/adr та HL-60/vinc) протягом 72 год дала такі значення $IC_{50} = 0,9$,

2,3, 9,3 та 2,4 мкг/мл відповідно (табл. 7). Для клітин ліній Jurkat і HL-60/wt значення IC_{50} для mag.SLPs були значно вищими порівняно з IC_{50} для доксорубіцину, яка становила 0,3 мкг/мл для Т-лімфоцитів Jurkat і 0,6 мкг/мл для клітин лейкозу HL-60 (після 24 год обробки) (табл. 6). Водночас резистентні сублінії були більш чутливими до mag.SLPs, ніж до Dx. Зокрема, значення IC_{50} для mag.SLPs для сублінії HL-60/adr була в 3,2 раза нижчим (1,9 мкг/мл) порівняно з Dx (6 мкг/мл). Для клітин лінії HL-60/vinc значення IC_{50} для mag.SLPs також було в 1,3 рази нижчим (2,3 мкг/мл) порівняно з IC_{50} для Dx (3 мкг/мл).

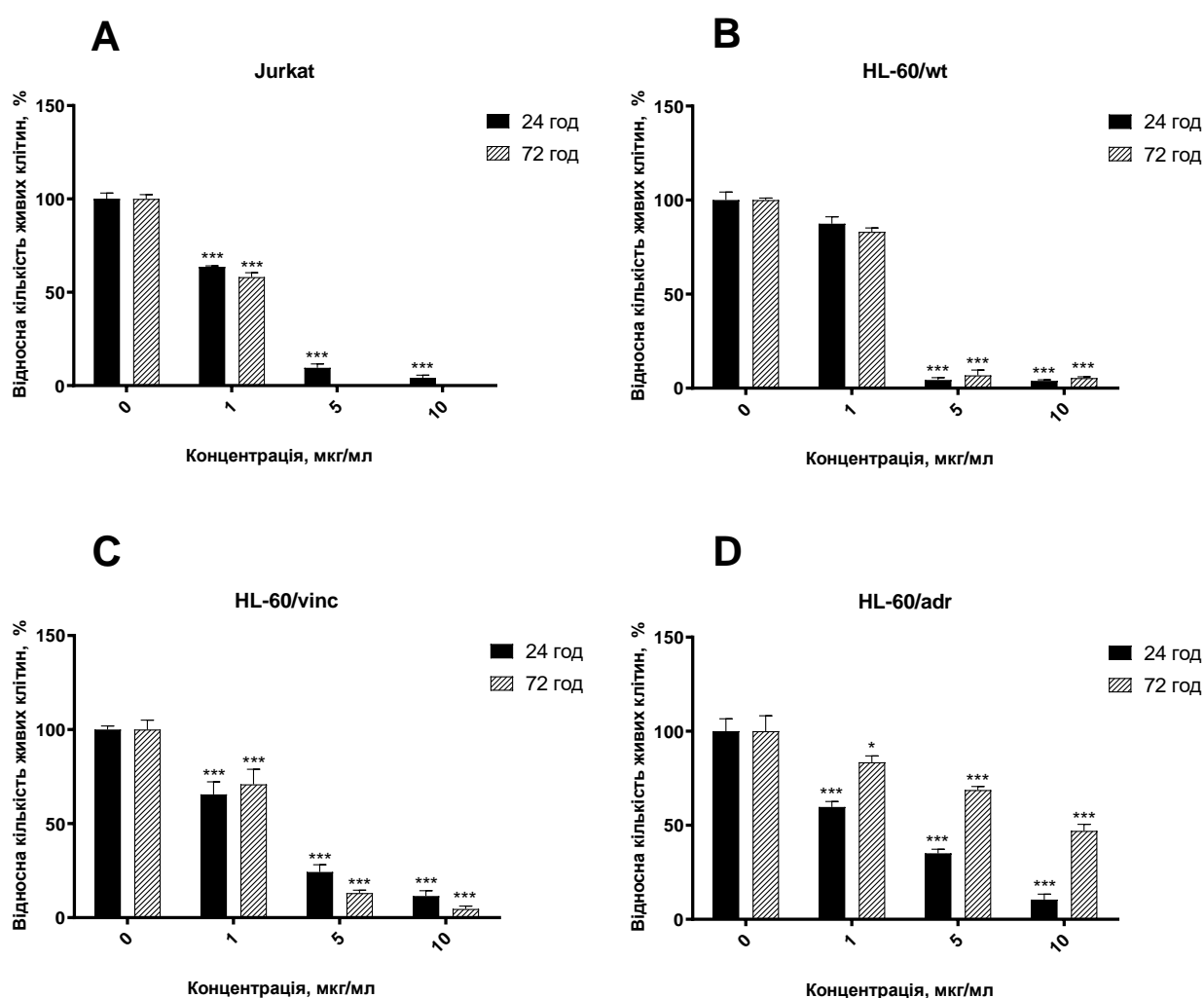


Рис. 33. Результати вивчення цитотоксичної дії магнітних наночастинок mag.SLPs щодо (А) Т-лімфоцитів лінії Jurkat, (В) клітин лінії HL-60/wt мієлоїдного лейкозу людини, (D) клітин лінії HL-60/adr мієлоїдного лейкозу людини, резистентних до доксорубіцину, та (С) клітин лінії HL-60/vinc мієлоїдного лейкозу

людини, резистентних до вінкристину, визначали за допомогою тесту на виключення трипановим синім на 24 та 72 години. $*p \leq 0,05$, $***p \leq 0,001$ щодо необроблених клітин (контроль).

Mag.SLPs є складною системою, що складається з декількох компонентів, включаючи ліпідну оболонку та оксид феруму (IO), які можуть брати участь у цитотоксичній активності. Щоб з'ясувати походження цієї активності, порівнювали цитотоксичні ефекти mag.SLPs, SLPs, IO-OA та IO по відношенню до Т-клітин лінії Jurkat та клітин лінії HL-60/wt через 24 та 72 години після обробки, використовуючи тест з виключення трипанового синього та МТТ тест (Рис. 35). Для клітин лінії Jurkat наночастинки IO, IO-OA та SLP виявилися значно менш цитотоксичними в тесті на виключення трипанового синього порівняно з mag.SLP, особливо при найвищій концентрації 10 мкг/мл (Рис. 35). Більше того, за обробки Т-клітин лінії Jurkat частинками IO-OA цитотоксичного ефекту не було виявлено через 24 год інкубації, і лише помірна цитотоксичність була зафіксована через 72 год. Згідно з МТТ тестом, mag.SLPs мали таку ж цитотоксичність, як SLPs, IO-OA та IO в концентрації 1 мкг/мл (Рис. 35 а, б). При десятикратному збільшенні концентрації, як магнітні частинки mag.SLPs, так і тверді ліпідні частинки SLPs виявляли подібну цитотоксичність, яка була значно вищою, ніж у IO-OA та IO. У клітинах лінії Jurkat, оброблених різними модифікаціями частинок протягом 24 год, значення IC_{50} для mag.SLPs становило 3,8 мкг/мл, тоді як IC_{50} для SLPs, IO-OA та IO перевищувало 10 мкг/мл (Таблиця 6). Значення IC_{50} для mag.SLPs становило 0,9 мкг/мл для клітин Jurkat, оброблених частинками протягом 72 год, тоді як IC_{50} для SLPs становило 10 мкг/мл, а IC_{50} для IO-OA та IO становило – понад 10 мкг/мл (табл. 7). Dx виявив більш виражену токсичність, ніж mag.SLPs, SLPs, IO-OA та IO по відношенню до клітин лінії Jurkat як через 24, так і через 72 год після обробки (Таблиця 6, 7).

Крім того, клітини HL-60/wt були більш чутливими до цитотоксичної дії частинок. У тесті на виключення трипанового синього, частинки у концентрації 1

мкг/мл показали подібну цитотоксичність щодо клітин Jurkat і HL-60/wt в обох часових інтервалах – через 24 і 72 год (Рис. 34).

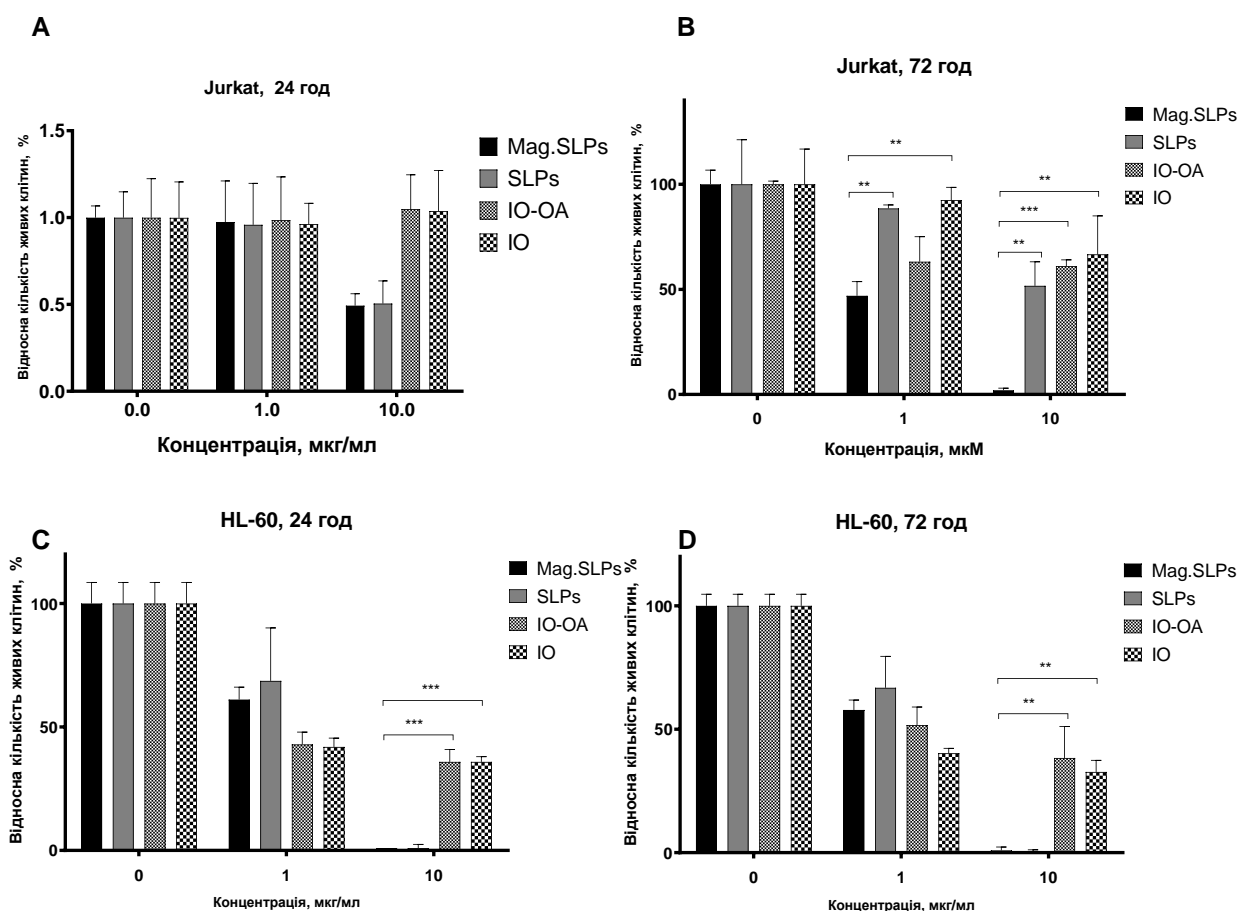


Рис. 34. Результати вивчення цитотоксичної дії різних типів частинок на основі оксиду феруму mag.SLPs, SLPs, IO-OA, IO щодо (А, В) Т-лімфоцитів лінії Jurkat та (С, D) клітин лінії HL-60/wt мієлоїдного лейкозу визначали за допомогою тесту на виключення трипанового синього, на 24-у години та 72-у години інкубації (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$) щодо впливу mag.SLPs.

Однак mag.SLPs і SLPs у концентрації 10 мкг/мл виявили більш виражену протипухлинну активність порівняно з IO-OA та IO по відношенню до клітин HL-60/wt (Рис. 35 с, d). Аналогічні результати були отримані по цитотоксичності наночастинок mag.SLPs і SLPs порівняно з наночастинками IO-OA та IO щодо клітин лінії HL-60/ wt, згідно з МТТ тестом. Цитотоксична дія магнітних та твердих ліпідних наночастинок була значно вищою порівняно з наночастинками IO-OA та IO. Зокрема, частинки з нижчим рівнем організації виявляли незначний

протипухлинний ефект лише за концентрації 1 мкг/мл (Рис. 35 с, d). Значення IC_{50} для mag.SLPs та їх компонентів була вищою, ніж IC_{50} для Dx по відношенню до клітин HL-60/ wt, проте ця різниця не була такою значною, як для клітин лінії Jurkat. Після 24 год інкубації з клітинами лінії HL-60/ wt значення IC_{50} для mag.SLPs, SLPs, IO-OA та IO становили 2,7; 3,5; 3,5 та 0,9 мкг/мл, відповідно (табл. 6). Значення IC_{50} для mag.SLPs після 72 год обробки клітин лінії HL-60/ wt становило 2,3 мкг/мл, IC_{50} для SLPs, IO-OA та IO - 3,3, 1,2 та 0,9 мкг/мл, відповідно (табл. 7).

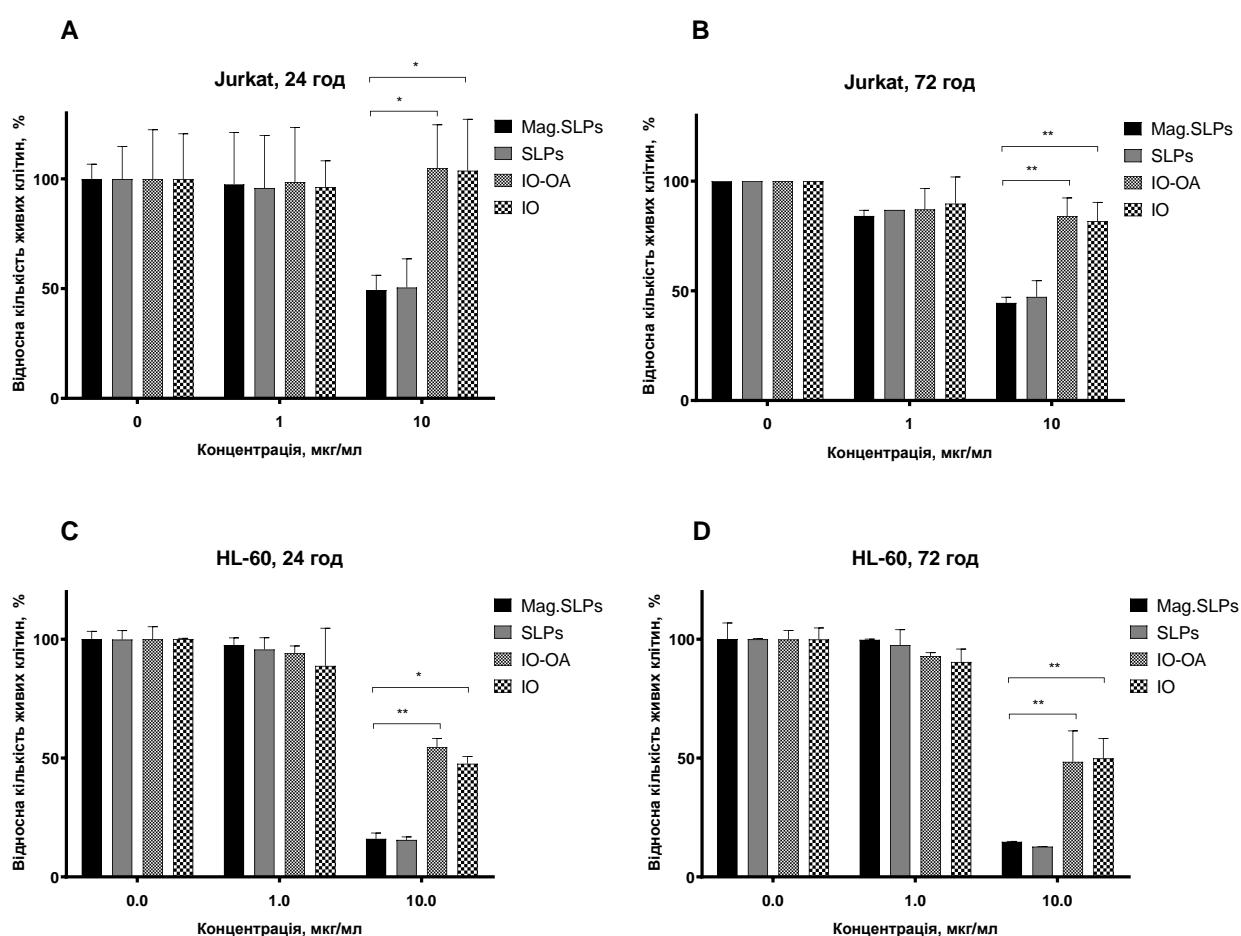


Рис. 35. Результати вивчення цитотоксичної дії різних типів частинок на основі оксиду феруму mag.SLPs, SLPs, IO-OA, IO щодо (A, B) Т-клітини лінії Jurkat та (C, D) клітин лінії HL-60/wt мієлоїдного лейкозу визначали за допомогою МТТ-тесту на (A,C) 24 год та (B,D) 72 год інкубації (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$) щодо необроблених клітин (контроль)

Таблиця 6. Напівмаксимальна інгібувальна концентрація IC₅₀ (мкг/мл) для різних типів наночастинок і доксорубіцину (Dx) щодо пухлинних ліній клітин, визначена за допомогою тесту на виключення трипанового синього на 24 год інкубації

<i>Клітинна лінія</i>	Mag.SLPs	SLPs	IO-OA	IO	Dox
<i>Jurkat</i>	3,8	10	>10	>10	0,1
<i>HL-60/wt</i>	2,7	3,5	3,5	0,9	0,6
<i>HL-60/adr</i>	1,9	-	-	-	6,0
<i>HL-60/vinc</i>	2,3	-	-	-	3,0

Таблиця 7. Значення LC₅₀ (мкг/мл) для різних типів наночастинок і доксорубіцину (Dx) для різних злоякісних клітинних ліній людини, визначена за допомогою тесту на виключення трипанового синього на 72 год інкубації.

<i>Клітинна лінія</i>	Mag.SLPs	SLPs	IO-OA	IO	Dox
<i>Jurkat</i>	0,9	>10	>10	>10	0,3
<i>HL-60/wt</i>	2,3	3,3	1,2	0,9	0,1
<i>HL-60/adr</i>	9,3	-	-	-	3,6
<i>HL-60/vinc</i>	2,4	-	-	-	0,8

Оцінка цитотоксичної активності наночастинок показала, що зі зростання складності структури відбувається посилення дії на злоякісні клітини твердих магнітних наночастинок. Це свідчить про те, що більш складна структура частинок і багатофункціональність проявляла вищу ефективність. Для всіх типів досліджуваних клітин цитотоксичність була дозозалежною, проте біологічна дія на клітини окремих компонентів наночастинок була неоднаковою. Це вказує на відмінності в поведінці та клітинній реакції на частинки IO та систему SLP, що може бути зумовлено поступовим вивільнення IO з ліпідної матриці. Висока цитотоксичність щодо клітин мієлоїдного лейкозу людини HL-60/adr і HL-60/vinc,

стійких до Dx і вінкристину, відповідно, вказує на низьку вразливість до механізмів множинної стійкості та явну перевагу mag.SLPs. Цитотоксичність mag.SLPs була вищою, ніж для Dx, що свідчить про потенціал mag.SLPs як ефективної альтернативи для лікування пухлинних клітин, стійких до традиційних протипухлинних препаратів. Важливо відзначити, що гіпертермічний ефект mag.SLPs, індукований змінним магнітним полем, слід відрізняти від цитотоксичності частинок. Оскільки гіпертермічний ефект сам по собі може викликати загибель клітин, то визначення цитотоксичності наночастинок за допомогою МТТ-тесту або тесту на виключення трипанового синього за присутності магнітного поля є недоцільним, оскільки це може спотворювати результати оцінки цитотоксичності частинок.

3.4.2. Визначення антиоксидантних та проапоптотичних властивостей магнітних наночастинок на основі оксиду феруму (III) mag.SLPs.

Хоча наночастинки оксиду феруму, в цілому, сприймаються як високобіосумісні та безпечні матеріали, їх цитотоксичність може бути спричинена генерацією радикальних форм кисню (АФО), опосередкованою реакцією Фентона (Wydra RJ, 2015). Порушення балансу АФО викликає оксидативний стрес у клітинах і призводить до шкідливих пошкоджень вуглеводів, ДНК, ліпідів та білків (Abakumov MA, 2018). Тому надмірна кількість АФО, індукована наночастинок оксиду заліза, може бути використана як ефективна стратегія для лікування пухлин (Shen Z, 2018; Sun L, 2018). Утворення АФО було запропоновано як потенційний механізм цитотоксичності, спричиненої mag.SLPs. Для з'ясування механізмів, відповідальних за протипухлинну дію розроблених частинок, було вивчено два параметри: продукцію АФО ($O_2^{\cdot -}$ -радикалів і H_2O_2) та проапоптотичні зміни в морфології клітин, індуковані mag. SLP, SLP, IO-OA та IO частинками в пухлинних клітинах людини, зокрема у Т-клітинах лінії Jurkat лейкозу людини. Оскільки ліпідна матриця є єдиним захистом наночастинок IO після вивільнення, їх поверхня піддається дії багатьох компонентів, зокрема H_2O_2 , який утворюється супероксиддисмутазою з $O_2^{\cdot -}$ -радикалів у реакції диспропорціювання (Sun L,

2018). Відомо, що іони Fe^{2+} або Fe^{3+} реагують з H_2O_2 згідно реакцією Фентона, утворюючи гідроксильні радикали (OH^\cdot), які можуть бути ефективними у протипухлинній терапії (Eguchi H, 2015); їх концентрація корелює з рівнем $\text{O}_2^{\cdot-}$ -радикалів. Варто зазначити, що $\text{O}_2^{\cdot-}$ -радикали більш шкідливі для нормальних тканин і органів, ніж H_2O_2 (Phaniendra A, 2015). Сильна цитотоксична активність mag.SLPs (Рис. 33, 34), корелює з їхньою вищою здатністю індукувати генерацію АФО (Рис. 36). Значно підвищений $\text{O}_2^{\cdot-}$ -рівень спостерігали лише для mag. SLPs, тоді як підвищена концентрація H_2O_2 була виявлена для кожного типу досліджуваних частинок, хоча не всі результати були статистично значущими. Це може бути пов'язано з нижчою концентрацією частинок (5 мкг/мл), які використовували в аналізі АФО, порівняно з максимальною концентрацією (10 мкг/мл) в аналізах життєздатності. Раніше ми виявили, що Dx (0,5-1 мкМ) не мав значного впливу на рівень H_2O_2 у клітинах лінії Jurkat, тоді як рівень АФО зріс приблизно вдвічі лише через 24 год лікування (Panchuk R, 2017). Водночас $\text{O}_2^{\cdot-}$ -рівень підвищився у 2,5 раза після 24 год обробки клітин Dx порівняно з контрольними необробленими клітинами (Panchuk R, 2017). Слід зазначити, що хоча утворення H_2O_2 за дії Dx відбувалося досить пізно - лише після 24 год обробки, індукцію $\text{O}_2^{\cdot-}$ -радикалів виявляли вже через 3 год після початку дії Dx. Ці результати узгоджуються з літературними даними, де магнітні наночастинки оксиду феруму підвищували рівень АФО у різних клітинних лініях *in vitro* та на тваринних моделях (Mahmoudi M, 2011). Наприклад, магнітні наночастинки оксиду феруму, вкриті поліетиленіміном або полі(акриловою кислотою), зменшували збільшення маси тіла матері та збільшення внутрішньоутробної смерті у вагітних мишей CD-1 (Di Bona KR, 2014). Маг. SLP та SPL виявляли подібну цитотоксичність щодо ракових клітин (Рис. 34, 35). Проте mag.SLPs у високій концентрації (5 мкг/мл) викликали значне збільшення $\text{O}_2^{\cdot-}$ -рівень у клітинах Jurkat (Рис. 36), що не спостерігалося за дії немагнітних твердих ліпідних частинок (SPL).

Для вимірювання рівня АФО у клітинах лінії Jurkat, оброблених усіма чотирма типами частинок, використовували традиційну проточну цитофлуориметрію. Метод базується на використанні флуоресцентних барвників DCFDA та DHE для

виявлення H_2O_2 та супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\cdot-}$) відповідно. Під час обробки клітин лінії Jurkat частинками mag.SLPs, SLPs, IO-OA та IO, лише магнітні частинки mag.SLPs індукували продукцію як H_2O_2 , так і $O_2^{\cdot-}$ -радикалів (Рис. 36). Незначне збільшення флуоресценції DCFDA, що вказує на підвищену концентрацію H_2O_2 , спостерігали за обох концентрацій частинок (1 і 5 мкг/мл), особливо для mag.SLPs (Рис. 36). Натомість посилення флуоресценції DHE, пов'язане зі зростанням концентрації $O_2^{\cdot-}$, було виявлено лише для mag.SLPs за високої концентрації (Рис. 36). Рівні H_2O_2 та $O_2^{\cdot-}$ -радикалів в оброблених mag.SLPs Т-клітинах лінії Jurkat лейкозу людини зростали на 20-40 % та 70 %, відповідно.

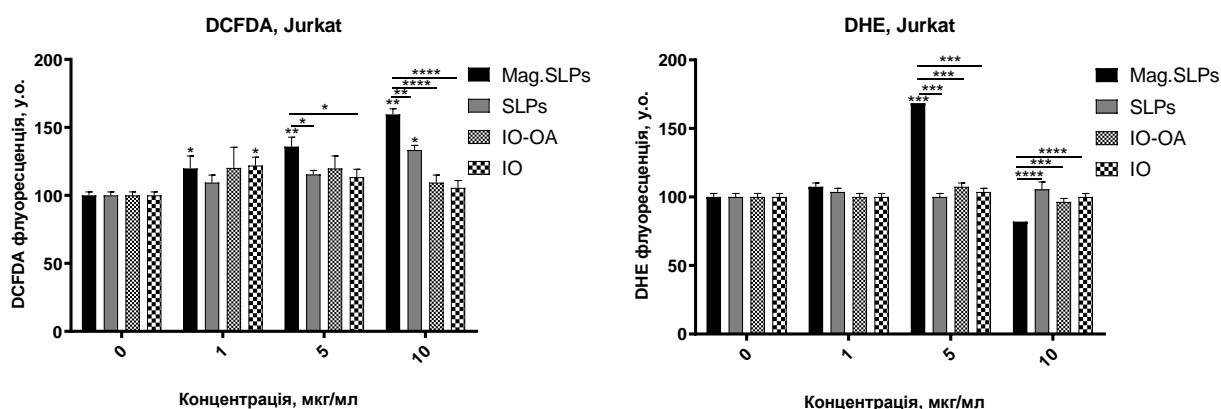


Рис. 36. Вплив мінеральних наночастинок, створених на основі оксиду феруму, на продукцію гідроген пероксиду та супероксидних-аніон-радикалів у Т-клітинах лінії Jurkat лейкозу людини. Фарбування DCFDA та DHE, проточна цитофлуориметрія.

Щоб з'ясувати механізми індукції клітинної загибелі магнітними СЛП було використано метод забарвлення пропідію йодидом (Рис. 37). Виявлено, що mag.SLPs, SLPs, IO-OA та IO в дозі 1 мкг/мл були нетоксичними для Т-клітин лінії Jurkat лейкозу людини, а також не впливали на прогресію клітинного циклу. На відміну від них, доксорубіцин (позитивний контроль) спричиняв блокування

клітин у S/G2-фазі оброблених клітин. Однак, у дозі 5 мкг/мл mag.SLPs показали найвищий рівень цитотоксичної активності (>76% клітин у пре-G1 фазі), тоді як SLPs у тій же дозі індукували загибель 69% клітин Т-лімфоцитів лінії Jurkat (Додаток 9, Таблиця 10). У той же час, жодних ознак цитотоксичності в дозі 5 мкг/мл не було виявлено ні для IO-OA, ні для IO, що свідчить про те, що лише mag.SLPs були спрямовані на пухлинні клітини та ефективно їх вбивали.

Подвійне забарвлення анексином V/PI підтвердило результати вивчення клітинного циклу. Для низьких доз mag.SLPs не спостерігали ознак екстерналізації фосфатидилсерину (ранньої ознаки апоптозу). Натомість за вищих концентрацій (5 мкг/мл) магнітні частинки призводили до масивного пізнього апоптозу, що характеризувався як екстерналізацією AnV, так і розривом клітинної мембрани клітин-мішеней (Додаток 9, Рис. 63) Таким чином, у високих дозах (5 мкг/мл) mag.SLPs і, меншою мірою, SLPs виявляли проапоптотичну активність щодо Т-клітин лінії Jurkat лейкозу людини, але такий ефект був відсутній для IO-OA та IO.

FACSаналіз співвідношення AnV(+)/PI(–) (проапоптотичні клітини), AnV(+)/PI(+) (пронекротичні клітини) та кількості клітин проапоптотичної (пре-G1) фази було використано для з'ясування механізмів загибелі клітин під впливом магнітних частинок (Додаток 9, Рис. 63; Рис. 37). Спостерігали дозозалежний ефект дії, а саме зменшення дози mag.SLPs і SLPs також зменшувало кількість некротичних клітин. Відомо, що як апоптоз, так і некроз є основними механізмами загибелі клітин, індукованими різними чинниками. Однак індукція апоптозу або некрозу сильно залежить від дози та тривалості дії цитотоксичного агента. Таким чином, не існує «чистих» індукторів апоптозу або некрозу, оскільки тривала дія індуктора апоптозу або застосування вищих доз може викликати вторинний некроз клітин. Тому механізми, пов'язані з апоптозом і некрозом, можуть бути відповідальними за цитотоксичну дію mag.SLPs і SLPs на клітини Jurkat.

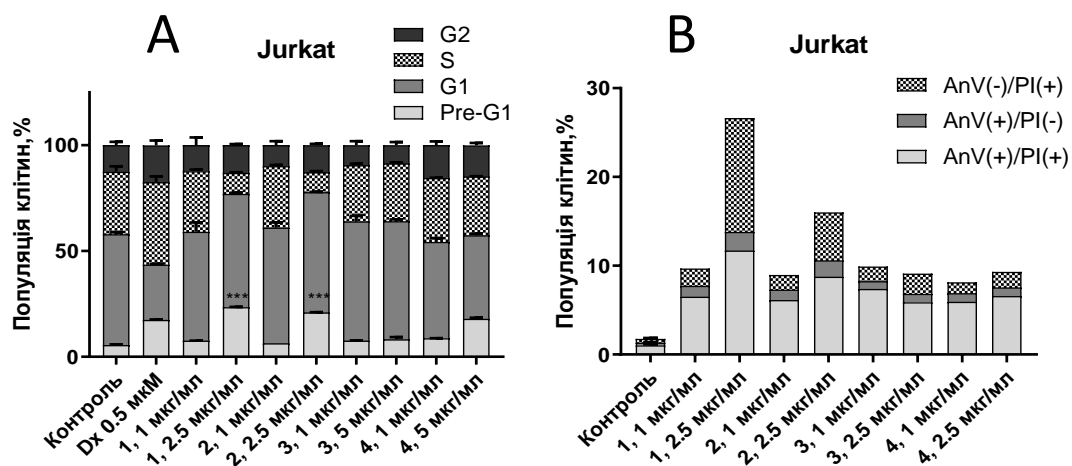


Рис. 37. Зупинка клітинного циклу та індукція клітинної загибелі за допомогою mag.SLPs (A) Вплив зазначених доз сполук на розподіл Т-клітин лінії Jurkat лейкозу людини у різних фазах клітинного циклу визначали за допомогою FACS аналізу, забарвлення пропідію йодидом, після 24 год безперервної експозиції. (B) Оцінка впливу mag.SLPs (24-годинна інкубація) на екстерналізацію фосфатидилсерину в Т-клітинах лінії Jurkat лейкозу людини визначалася за допомогою FACS аналізу з використанням FITC-міченого аннексину V і PI фарбуванням. Показано один із трьох експериментів, в яких отримано порівняльні дані.

1 - mag.SLPs, 2 – SLPs. 3 - IO-OA. 4 – IO, Dx – доксорубіцин (позитивний контроль). ***- $p \leq 0,001$, порівняння відносно необроблених (контроль) клітин.

На основі проведених досліджень магнітних наночастинок як багатофункціональних наноматеріалів можна сформулювати наступні висновки:

1. Розроблені магнітні тверді ліпідні наночастинок володіють значним протипухлинним потенціалом щодо суспензійних клітин лейкозного походження. Їх цитотоксична дія може бути зумовлена як ліпідною оболонкою, так і ядром IO, які окремо виявляють низьку токсичність, демонструючи цитотоксичний ефект лише у високих дозах (5-10 мкг/мл). Можливий синергічний внесок цих компонентів у спричиненій цитотоксичності.

2. Потенційний механізм цитотоксичності, спричиненої mag.SLPs пов'язаний із утворенням АФО, що індукують клітинну загибель. Встановлено, що лише магнітні частинки mag. SLPs індукували продукцію як H_2O_2 , так і O_2^- -радикалів.

3. Механізми індукції клітинної загибелі включають апоптоз (експресія білків, пов'язаних з апоптозом, міжнуклеосомна фрагментація ДНК і зміни клітинного циклу) та некроз (екстерналізація фосфатидилсерину в плазматичній мембрані, забарвленій за допомогою анексину V і розрив мембрани, виявлений за допомогою забарвлення клітин PI.

4. Магнітні тверді ліпідні частинки (mag.SLPs) є перспективними багатофункціональними наноматеріалами, які можуть бути використані як системи для доставки ліків.

Результати досліджень даного розділу опубліковано в статті:

Świątek M., Panchuk R., **Skorokhyd N.**, Černoch P., Finiuk N., Klyuchivska O., Hrubý M., Molčan M., Berger W., Trousil J., Stoika R., Horák D. Magnetic Temperature-Sensitive Solid-Lipid Particles for Targeting and Killing Tumor Cells *Frontiers in Chemistry*. 2020. Vol .8, No. 205. P.1–18 (**IF – 3,8 Q1**)_DOI:[10.3389/fchem.2020.00205](https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00205)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7161697/>

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розробка і використання багатофункціональних наноматеріалів є актуальним завданням різних сфер людської діяльності - від промисловості до медицини.. Істинні наноматеріали можна модифікувати завдяки хімічним групам на їхній поверхні, що дозволяє надавати їм багатофункціональності, покращувати властивості та біологічну дію іммобілізованих на них медикаментів (Torchilin VP, 2014). Однією з вимог впровадження лікарських засобів у клінічну практику є пошук нових ліків та покращення ефективності відомих медикаментів. Ця робота присвячена дослідженню терапії раку, зокрема протипухлинних препаратів, які широко використовуються у схемах хіміотерапії, таких як доксорубіцин (Minotti G, 2004; Zhao M, 2017), а також застосуванню експериментальних сполук, зокрема ізохінонових алкалоїдів (Qing Z, 2017) і мінеральних наночастинок з покращеними властивостями через функціоналізацію ядра (Muñoz de Escalona M, 2016; Mishra V, 2018). Для покращення адресної дії вивчалися полімерні нанорозмірні носії різної будови та молекулярної маси. Розроблені підходи включали підвищення біодеградабельності шляхом прищеплення до полімерних носіїв фрагментів поліетиленгліколю (ПЕГ), поліетилосазоліну. Така функціоналізація забезпечувала стабільність наноматеріалів, біосумісність і покращену цільову доставку лікарських засобів. Використанні у дослідженнях гребенеподібні ПЕГ-вмісні полімерні наноносії не проявляли токсичності *in vitro* та *in vivo* (Kobylynska L, 2018). Було досліджено нанокомпозити з новітніми ПЕГ-вмісними наноносіями та експериментальними протипухлинними препаратами, які показали покращення розчинності, а отже, і біодоступності сполук, а також забезпечили зменшення загальної токсичності досліджуваних препаратів *in vivo* (Kobylynska L, 2019).

У наших дослідженнях було випробовано кілька багатофункціональних наноматеріалів для покращення ефективності лікування злоякісних новоутворень:

1) застосовано ко-іммобілізацію доксорубіцину – «золотого стандарту» хіміотерапії – на полімерному наноносії полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ, функціоналізованому канабіміметиком N-стеароїлетаноламіном;

2) для підвищення водорозчинності, біосумісності та терапевтичної ефективності ізохінонових алкалоїдів застосовано їх іммобілізацію на трьох різних гребенеподібних амфифільних полімерних носіях із різними модифікаціями будови;

3) досліджено протипухлинну активність нових наночастинок на основі оксиду заліза(III), функціоналізованих олеїною кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном) як потенційних систем для доставки лікарських засобів.

У рамках 1-го етапу експериментальної частини даної роботи було показано, що іммобілізація NSE разом з доксорубіцином на новітніх полімерних нанорозмірних носіях дозволила не тільки підвищити розчинність NSE у водних розчинах, але й значно вплинути на молекулярні механізми протипухлинної дії доксорубіцину. Було показано, що така комбінація посилює цитотоксичну активність Dx-PC-NSE *in vitro* завдяки двом різним механізмам: посиленому проникненню у клітини-мішені через підвищену ліпофільність системи доставки препарату та посиленому вивільненню доксорубіцину у цитозолі пухлинних клітин за допомогою PC-NSE. Наноконізати, що містять доксорубіцин і NSE, значно швидше проникають у злоякісні клітини порівняно не лише з нативним доксорубіцином, але й із доксорубіцином, іммобілізованим на аналогічному носії без NSE. Встановлено, що це явище пов'язане з ліпофільністю молекули NSE, яка прискорює процес проникнення в клітини та сприяє подоланню набутої резистентності злоякісних клітин до хіміотерапії, зумовленої надекспресією Р-глікопротеїну та MRP-1. Застосування цих наноконізатів доксорубіцину з NSE у терапії двох пухлин мієлоїдного походження - лімфоми NK/Ly та лейкозу L1210 - показало покращення терапевтичного ефекту, що полягало у збільшенні тривалості життя піддослідних тварин та зменшенні негативних побічних ефектів доксорубіцину, зокрема його кардіотоксичності та гепатотоксичності.

На другому етапі роботи було вивчено протипухлинний потенціал нанокомпозитів берберину та його синтетичного алкільного похідного - 9-О-октил-берберину. Імобілізації цих гідрофобних препаратів на полімерних носіях різної структури забезпечила їхню водорозчинність і пролонговану протипухлинну дію. Вивчення цитотоксичної активності нанокомпозитів алкалоїдів та молекулярних механізмів протипухлинної дії дозволило відібрати кращий варіант для застосування цих експериментальних сполук для терапії меланоми миші B16/F10. Дослідження на тваринах показали покращення терапевтичної дії берберину та 9-О-октил-берберину на полі(2)-оксазоліновому наноносії, що забезпечило одужання 60% мишей з меланою B16/F10 та значне зменшення розміру пухлини. Медикаментозні засоби природного походження з біологічною активністю все частіше застосовують як хіміотерапевтичні препарати (Cragg GM, 2016; Kinghorn AD, 2016; Abd El-Wahab AE, 2013). Серед них алкалоїди демонструють високу протипухлинну активність, бактеріоцидні та протизапальні властивості (Mondal A, 2019, Qing Z, 2017). Отримані результати підтверджують перспективність використання нанокомплексів берберину для потенційної протипухлинної терапії. Імобілізація берберину на полімерних носіях дозволяє впливати на його активність, підвищуючи ефективність дії на злоякісні клітини при збереженні безпечності для нормальних клітин.

При виконанні цього етапу роботи вивчали безпечність нативних полімерних носіїв *in vitro* та *in vivo*. Встановлено, що три типи досліджуваних полімерів не володіють вираженою цитотоксичністю на різні типи пухлинних і псевдонормальних клітин навіть у надвисоких концентраціях (>50 мкМ). Найкращі показники біосумісності виявляв полімерний носій VEP-co-GMA, функціоналізований полі-2-оксазоліном, який був використаний у подальших дослідженнях як платформа для доставки експериментальних протипухлинних препаратів.

Ми вивчали тверді ліпідні частинки (SLP), які володіють дещо кращими властивостями порівняно з ліпосомами, а саме біорозкладністю, біосумісністю і мають вищу ефективність захоплення (Albuquerque J, 2015; Brezaniowa I, 2016).

На завершальному етапі досліджень було оцінено протипухлинний потенціал магнітних наночастинок на основі оксиду феруму (mag. SLPs). Показано, що ці наночастинок проявляють протипухлинну активність щодо різних типів лейкозних клітинних ліній і здатні долати множинну лікарську резистентність

Магнітні наночастинок виявили вищу цитотоксичну активність, ніж нативний доксорубіцин, зокрема на резистентних до медикаментів субліній клітин – HL-60/vinc та HL-60/adr – гострого промієлоцитарного лейкозу людини. Встановлено, що підвищення цитотоксичності mag.SLPs пов'язане з індукцією генерації АФО. Рівень продукції H_2O_2 у лейкемічних клітинах зростає на 20–40%, а рівень $O_2^{\cdot -}$ — на 70%. FACS аналіз клітинного циклу виявив значне збільшення кількості клітин лінії Jurkat у проапоптотичній фазі (пре-G1) під впливом mag.SLPs у концентрації понад 5 мкг/мл. Таким чином, розроблені магнітні наночастинок володіють багатообіцяючими характеристиками для застосування у протипухлинній терапії, особливо в контексті подолання резистентності до хіміотерапії. Додаткова біофункціоналізація mag.SLPs за допомогою медикаментозних засобів може бути перспективним напрямом у створенні ефективних систем адресної доставки препаратів.

Підсумовуючи вищесказане, науково-практичне значення цієї роботи полягає у розробці стратегії для підвищення ефективності дії вже відомих протипухлинних препаратів (доксорубіцину) та збільшення протипухлинного потенціалу експериментальних засобів (берберину та 9-О-октил-берберину) шляхом їх ко-імобілізації на нанорозмірних носіях. Вивчення цитотоксичної активності магнітних наночастинок на основі оксиду феруму показало їх значний потенціал у лікуванні злоякісних захворювань і подоланні множинної медикаментозної резистентності. Подальші дослідження використаних багатофункціональних наноматеріалів на ширшому колі експериментальних пухлин і лабораторних тварин, за умови їхньої успішності, можуть відкрити можливість впровадження розроблених підходів у клінічну онкологію як альтернативної схеми цілеспрямованої доставки традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше з'ясовано молекулярні механізми цитопротекторної активності канабіметика N-стеароїлетаноламіну за дії доксорубіцину та вивчено протипухлинний потенціал алкільних дериватів алкалоїда берберину. Також показано підвищення ефективності дії цих препаратів шляхом їхньої іммобілізації на нанорозмірних носіях полімерної природи.

1. Встановлено, що збільшення цитотоксичної активності Dх-PC-NSE *in vitro* зумовлене двома різними механізмами: посиленням проникнення у клітини-мішені завдяки підвищеній ліпофільності системи доставки препарату, а також посиленням за допомогою PC-NSE вивільненням Dх у цитозолі пухлинних клітин.

2. Виявлене дозозалежне посилення ко-іммобілізованим N-стеароїлетаноламіном терапевтичної активності Dх щодо двох типів мишачих пухлин: лімфоми NK/Ly та лейкозу L1210.

3. Функціоналізація полімерної платформи за допомогою NSE для цільової доставки доксорубіцину дозволяє значно зменшити токсичний вплив останнього на організм лабораторних мишей. NSE сприяє нормалізації гематологічних і біохімічних показників, покращує виживаність мишей і нормалізує їхню масу. При цьому показники морфо-функціонального стану тварин за дії вільного доксорубіцину і його кон'югованої форми з полімерним носієм були значно порушені.

4. Вперше доведено ефективність іммобілізації берберину та 9-О-октил-берберину на трьох різних типах полімерних носіїв з гетероатомними бічними ланцюгами, що забезпечують їхню водорозчинність та біодеградабельність.

5. Дослідження життєздатності клітин *in vitro* показали, що іммобілізація берберину та його синтетичного похідного на полімерних носіях призводить до посилення токсичної дії щодо пухлинних клітин, порівняно з вільними формами. Ступінь зниження життєздатності клітин під впливом наноконструкцій берберину (PC-PEG-Berb, PC-pEtOx-Berb, PC-PEGMA-Berb) залежить від типу полімерного носія. У той же час, нативні полімерні носії (PC-PEG, PC-pEtOx, PC-PEGMA) у

вільній формі не викликають значного зниження життєздатності клітин у концентраціях, необхідних для доставки 50 мкМ берберину, що свідчить про їхню біосумісність.

6. Використання нанокомплексів значно покращує розчинність алкалоїду берберину та 9-О-октил-берберину, підвищує їхню біодоступність і забезпечує кращий терапевтичний ефект щодо лікування меланоми B16/F10 у мишей, сприяючи повному одужанню 60% тварин і нормалізації їхніх життєво важливих показників.

7. Усі три типи досліджуваних полімерів не мають вираженого цитотоксичного впливу на різні типи пухлинних і псевдонормальних клітинних ліній навіть у надвисоких концентраціях (>50 мг/мл) і не викликають негативних побічних ефектів у тварин. Найкращі показники біосумісності виявив полімерний носій VER-co-GMA, функціоналізований полі-2-оксазоліном, який має потенціал для подальшого використання як платформа для доставки протипухлинних препаратів.

8. Проведене дослідження твердих ліпідних магнітних частинок mag. SLPs показало їхній значний потенціал у протипухлинній терапії завдяки високій цитотоксичності та здатності долати множинну лікарську резистентність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abakumov M. A., Semkina A. S., Skorikov A. S., Vishnevskiy D. A., Ivanova A. V., Mironova E., et al. Toxicity of iron oxide nanoparticles: Size and coating effects. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2018 32:e22225. doi:<https://doi.org/10.1002/jbt.22225>
2. Abbas NAT, Awad MM, Nafea OE. Silymarin in combination with chlorogenic acid protects against hepatotoxicity induced by doxorubicin in rats: possible role of adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway. *Toxicol Res (Camb)*. 2020 Nov 24;9(6):771-777. doi: <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa080>.
3. Abbasi R., Shineh, G., Mobaraki, M. Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. *J Nanopart Res* 25, 43 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05690-w>
4. Abd El-Wahab A. E., Ghareeb D. A., Sarhan E. E., Abu Serie M. M., El Demellawy M. A. In vitro biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, antiacetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complement. Altern. Med.* 2013 13:218. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-218>
5. Albuquerque J., Moura C., Sarmiento B., Reis S. Solid lipid nanoparticles: a potential multifunctional approach towards rheumatoid arthritis theranostics. *Molecules*. 2015 20, 11103–11118. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules200611103>
6. Alemzadeh E, Allahqoli L, Mazidimoradi A, Alemzadeh E, Ghasemi F, Salehiniya H, Alkatout I. Deciphering resistance mechanisms and novel strategies to overcome drug resistance in ovarian cancer: a comprehensive review. *Oncol Res*. 2024 Apr 23;32(5):831-847. doi: <https://doi.org/10.32604/or.2024.031006>.
7. Aloss K, Hamar P. Recent Preclinical and Clinical Progress in Liposomal Doxorubicin. *Pharmaceutics*. 2023 Mar 9;15(3):893. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030893>.
8. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med*. 2019 Sep 5;4(3):e10143. doi: <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>.

9. Atefi M, von Euw E, Attar N, Ng C, Chu C, Guo D, Nazarian R, Chmielowski B, Glaspy JA, Comin-Anduix B, Mischel PS, Lo RS, Ribas A. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. PLoS One. 2011;6(12):e28973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028973>
10. Awashra M, Mlynarz P. The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an *in vitro* metabolomic perspective. Nanoscale Adv. 2023 Jan 30;5(10):2674-2723. doi: <https://doi.org/10.1039/d2na00534d>.
11. Bangham A.D. Surrogate cells or trojan horses. The discovery of liposomes. BioEssays. 1995;17:1081–1088. doi: <https://doi.org/10.1002/bies.950171213>
12. Baniyash M, Sade-Feldman M, Kanterman J. Chronic inflammation and cancer: suppressing the suppressors. Cancer Immunol Immunother. 2014 Jan;63(1):11-20. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1468-9>.
13. Beech JR, Shin SJ, Smith JA, Kelly KA. Mechanisms for targeted delivery of nanoparticles in cancer. Curr Pharm Des. 2013;19(37):6560-74. doi: <https://doi.org/10.2174/1381612811319370002>.
14. Berkowitz A. E., Schuele W. J., Flanders P. J. Influence of crystallite size on the magnetic properties of acicular γ -Fe₂O₃ particles. J. Appl. Phys. 1968 39, 1261–1263. doi: <https://doi.org/10.1063/1.1656256>
15. Bhagat A, Shrestha P, Jeyabal P, Peng Z, Watowich SS, Kleinerman ES. Doxorubicin-induced cardiotoxicity is mediated by neutrophils through release of neutrophil elastase. Front Oncol. 2022 Aug 10;12:947604. doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.947604>.
16. Bhagyalalitha M, Handattu Shankaranarayana A, Arun Kumar S, Singh M, Pujar KG, Bidye D, Veeranna Pujar G. Advances in HER2-Targeted Therapies: From monoclonal antibodies to dual inhibitors developments in cancer treatment. Bioorg Chem. 2024 Oct;151:107695. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107695>.
17. Bhatia K, Bhumika, Das A. Combinatorial drug therapy in cancer - New insights. Life Sci. 2020 Oct 1;258:118134. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118134>.

18. Bi H, Xue J, Jiang H, Gao S, Yang D, Fang Y, Shi K. Current developments in drug delivery with thermosensitive liposomes. *Asian J Pharm Sci*. 2019 Jul;14(4):365-379. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.07.006> .
19. Bibi, A., & Ahmed, A. Synthetic Biology: Approaches, Opportunities, Applications and Challenges. *Abasyn Journal of Life Sciences*, 2020 3(Issue 2). Retrieved from <https://ajlifesciences.com/ojs/index.php/ajls/article/view/43>
20. Binkhathlan Z, Lavasanifar A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013 Mar;13(3):326-46. doi: <https://doi.org/10.2174/15680096113139990076>.
21. Bonifácio VDB. Ovarian Cancer Biomarkers: Moving Forward in Early Detection. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1219:355-363. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34025-4_18.
22. Brezaniova I., Hruby M., Kralova J., Kral V., Cernochova Z., Cernoch P., et al. . Temoporfin-loaded 1-tetradecanol-based thermoresponsive solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J. Control. Release*. 2016 241, 34–44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.009>
23. Broxterman HJ, Gotink KJ, Verheul HM. Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. *Drug Resist Updat*. 2009 Aug-Oct;12(4-5):114-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.07.001> .
24. Burger A.M.; Fiebig H.-H. Chapter 16-screening using animal systems. In *Anticancer Drug Development*; Baguley, B.C., Kerr, D.J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2002; pp. 285–299.
25. Cai Y, Xin Q, Lu J, Miao Y, Lin Q, Cong W, Chen K. A New Therapeutic Candidate for Cardiovascular Diseases: Berberine. *Front Pharmacol*. 2021 Mar 17;12:631100. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.631100>.
26. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57. <https://doi.org/10.1038/35025220>.
27. Chang L, Ruiz P, Ito T, Sellers WR. Targeting pan-essential genes in cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Cell*. 2021 Apr 12;39(4):466-479. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.12.008>.

28. Chauhan M, Singh RP, Sonali, Zia G, Shekhar S, Yadav B, Garg V, Dutt R. An Overview of Current Progress and Challenges in Brain Cancer Therapy Using Advanced Nanoparticles. *Recent Pat Nanotechnol.* 2024;18(3):295-304. doi: <https://doi.org/10.2174/1872210517666230815105031>.
29. Chen J., Duan Y., Yu X., Zhong J., Bai J., Li N. G., Xu J. Development of novel 9-O-substituted-13-octylberberine derivatives as potential anti-hepatocellular carcinoma agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2022 37(1), 2423–2433. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2118268>
30. Cheng Z, Huang H, Yin M, Liu H. Applications of liposomes and lipid nanoparticles in cancer therapy: current advances and prospects. *Exp Hematol Oncol.* 2025 Jan 31;14(1):11. doi: <https://doi.org/10.1186/s40164-025-00602-1>.
31. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006 Apr;6(4):662-8. doi: <https://doi.org/10.1021/nl052396o>.
32. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1310-6. <https://doi.org/10.1158/1078-0432> .
33. Cragg GM, Pezzuto JM. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Med Princ Pract.* 2016 25 Suppl 2 (Suppl 2):41-59. doi: <https://doi.org/10.1159/000443404>
34. Crompton, T.R. Functional Groups in Polymers. In *Practical Polymer Analysis*; Crompton, T.R., Ed.; Springer: Boston, MA, USA, 1993; pp. 241–255.
35. Dabholkar RD, Sawant RM, Mongayt DA, Devarajan PV, Torchilin VP. Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine conjugate (PEG-PE)-based mixed micelles: some properties, loading with paclitaxel, and modulation of P-glycoprotein-mediated efflux. *Int J Pharm.* 2006 Jun 6;315(1-2):148-57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.018>.
36. Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor and the

targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):291-317. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.016>.

37. Davis M., Zuckerman J., Choi C. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067–1070 (2010) <https://doi.org/10.1038/nature08956>.

38. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, Kitui SK, Manyazewal T. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med*. 2021 Aug 12;9:20503121211034366. doi: <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>. Erratum in: *SAGE Open Med*. 2024 Oct 29;12:20503121241288169. doi: <https://doi.org/10.1177/20503121241288169>.

39. Di Bona K. R., Xu Y., Ramirez P. A., De Laine J., Parker C., Bao Y., et al. Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. *Reprod. Toxicol*. 2014 50, 36–42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.09.010>

40. Dietrich B, Harald C, Matthias R, Brigitte V. *Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments*. Springer, 2013.

41. Discher DE, Eisenberg A. Polymer vesicles. *Science*. 2002 Aug 9;297(5583):967-73. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1074972>.

42. Dworak A, Trzebicka B, Kowalczyk A, Tsvetanov C, Rangelov S Polyoxazolines — mechanism of synthesis and solution properties. *Polimery*. 2014 59 (1):88-94. doi: <https://doi.org/10.14314/polimery.2014.088>

43. Eberl S, Renner B, Neubert A, Reisig M, Bachmakov I, König J, Dörje F, Mürdter TE, Ackermann A, Dormann H, Gassmann KG, Hahn EG, Zierhut S, Brune K, Fromm MF. Role of p-glycoprotein inhibition for drug interactions: evidence from in vitro and pharmacoepidemiological studies. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(12):1039-49. doi: <https://doi.org/10.2165/00003088-200746120-00004>.

44. Egbuna C, Parmar VK, Jeevanandam J, Ezzat SM, Patrick-Iwuanyanwu KC, Adetunji CO, Khan J, Onyeike EN, Uche CZ, Akram M, Ibrahim MS, El Mahdy NM, Awuchi CG, Saravanan K, Tijjani H, Odoh UE, Messaoudi M, Ifemeje JC, Olisah MC, Ezeofor NJ, Chikwendu CJ, Ibeabuchi CG. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical

Application: Nanotoxicology. J Toxicol. 2021 Jul 30;2021:9954443. doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>.

45. Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, Sato I, Kim JH, Hoshino Y, Lee J, Amemiya N, Sato M, Hirata K, Singh DJ, Masuda T, Yamamoto M, Urano T, Yoshida K, Tanigaki K, Yamamoto M, Sato M, Inoue S, Aoki I, Ishikawa Y. A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging. Sci Rep. 2015 Mar 17;5:9194. <https://doi.org/10.1038/srep09194>

46. Estelrich J., Sánchez-Martín M. J., Busquets M. A. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: From simple to dual contrast agents. Int. J. Nanomed. 2015 10, 1727–1741. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S76501>

47. Faghfuri E, Pourfarzi F, Faghfour AH, Abdoli Shadbad M, Hajiasgharzadeh K, Baradaran B. Recent developments of RNA-based vaccines in cancer immunotherapy. Expert Opin Biol Ther. 2021 Feb;21(2):201-218. doi: <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1815704>

48. Fang M., Ström V., Olsson R. T., Belova L., and Rao K. V. Particle size and magnetic properties dependence on growth temperature for rapid mixed co-precipitated magnetite nanoparticles. Nanotechnology. 2012 23:145601. doi: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/14/145601>

49. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS Nano. 2009 Jan 27;3(1):16-20. doi: <https://doi.org/10.1021/nn900002m> .

50. Finiuk N., Klyuchivska O., Mitina N., Kuznietsova H., Volianiuk K., Zaichenko A., ... & Stoika R. (2022). Antineoplastic Activity of Water-Soluble Form of Novel Kinase Inhibitor 1-(4-Chlorobenzyl)-3-chloro-4-(3-trifluoromethylphenylamino)-1 H-pyrrole-2, 5-dione immobilized on Polymeric Poly (PEGMA-co-DMM) Carrier. Scientia Pharmaceutica, 90(1), 7. DOI: <https://doi.org/10.3390/scipharm90010007> .

51. Francuskiewicz F (2013) Polymer fractionation. Springer Science & Business Media, 2013.

52. Gabizon A, Horowitz AT, Goren D, Tzemach D, Shmeeda H, Zalipsky S. In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. Clin Cancer Res. 2003 Dec 15;9(17):6551-9. PMID: 14695160.

53. Geran R.I. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.* 1972, 3, 51–61.
54. Geszke-Moritz M.; Moritz M. Biodegradable Polymeric Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems: Comprehensive Overview, Perspectives and Challenges. *Polymers* 2024, 16, 2536. <https://doi.org/10.3390/polym16172536>
55. Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol.* 2010;596:47-76. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-64> . PMID: 19949920.
56. Goldin A. Combined chemotherapy. *Oncology.* 1980;37 Suppl 1:3-8. doi: <https://doi.org/10.1159/000225489>.
57. Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM. Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids. *Biochimica et biophysica acta.* 1980;597(1):1-14.
58. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001;293(5531):876-80.
59. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews Cancer.* 2002;2(1):48-58.
60. Grigorian A, O'Brien CB. Hepatotoxicity Secondary to Chemotherapy. *J Clin Transl Hepatol.* 2014 Jun;2(2):95-102. doi: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00011>.
61. Gulaya N.M.; Kuzmenko A.I.; Margitich V.M.; Govseeva N.M.; Melnichuk S.D.; Goridko T.M.; Zhukov A.D. Long-chain N-acylethanolamines inhibit lipid peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia. *Chem. Phys. Lipids* 1998, 97, 49–54.
62. Han J, Lim J, Wang CJ, Han JH, Shin HE, Kim SN, Jeong D, Lee SH, Chun BH, Park CG, Park W. Lipid nanoparticle-based mRNA delivery systems for cancer immunotherapy. *Nano Conver.* 2023 Aug 7;10(1):36. doi: <https://doi.org/10.1186/s40580-023-00385-3> .
63. Hasannia M., Abnous, K., Taghdisi S.M. Synthesis of doxorubicin-loaded peptosomes hybridized with gold nanorod for targeted drug delivery and CT imaging of

metastatic breast cancer. J Nanobiotechnol 20, 391 (2022).
<https://doi.org/10.1186/s12951-022-01607-2>

64. Hickey J. W., Santos J. L., Williford J.-M., & Mao H.-Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society. 2015, 219, 536–547.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.006>

65. Huang X., Brazel C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. J. Control. Release. 2001 73, 121–136. doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00248-6)

66. Hudz I.A.; Chernyshenko V.O.; Kasatkina L.O.; Urvant L.P.; Klimashevskiy V.M.; Tkachenko O.S.; Kosiakova H.V.; Hula N.M.; Platonova T.M. N-Stearoylethanolamine Inhibits Integrin-Mediated Activation, Aggregation, and Adhesion of Human Platelets. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2022, 383, 2–10. doi: <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001084> .

67. Hula N.; Chumak A.; Berdyshev A.; Mehed O.; Horid'ko T.; Kindruk N.; Kosiakova H.; Zhukov O. Anti-inflammatory effect of N-stearoylethanolamine in experimental burn injury in rats. Ukr. Biokhimichniy Zhurnal 2009, 81, 107–116.

68. Hula N.M.; Khmel T.O.; Klimashevs'kyi V.M.; Kulik H.I.; Todor I.M. N-stearoylethanolamine inhibits growth and metastasis of the Lewis carcinoma and modulates lipid composition of the lung during tumorigenesis in mice. Ukr. Biokhimichniy Zhurnal 2006, 78, 135–142

69. Ibraheim MH, Maher I, Khater I. In Silico Repurposing of a Novel Inhibitor (drug) of EGFR and VEGFR-2 Kinases of Cancer by Pharmacokinetics, Toxicity, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulation. Appl Biochem Biotechnol. 2024 Nov;196(11):8332-8365. doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-024-04958-8>

70. Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine. Phytother Res. 2008 22 (8):999-1012. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.2399>

71. Jain M.M., Gupte S.U., Patil S.G. Paclitaxel injection concentrate for nanodispersion versus *nab*-paclitaxel in women with metastatic breast cancer: a

multicenter, randomized, comparative phase II/III study. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 156, 125–134. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3736-9>

72. Janaszewska A, Lazniewska J, Trzepiński P, Marcinkowska M, Klajnert-Maculewicz B. Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules.* 2019 Aug 1;9(8):330. doi: <https://doi.org/10.3390/biom9080330>

73. Ji P, Chen T, Li C, Zhang J, Li X, Zhu H. Comprehensive review of signaling pathways and therapeutic targets in gastrointestinal cancers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2025 Feb;206:104586. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104586>

74. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2011 Jun;6(4):715-28. doi: <https://doi.org/10.2217/nnm.11.19>.

75. Joo WD, Visintin I, Mor G. Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas.* 2013 Dec;76(4):308-14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.09.008>

76. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Sep 13;54(5):759-79. doi: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00047-9](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00047-9)

77. Kafrouni L., Savadogo O. (2016). Recent progress on magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Prog. Biomater.* 5, 147–160. doi: <https://doi.org/10.1007/s40204-016-0054-6>

78. Kang M., Weng Y., Liu Y. A Review on the Toxicity Mechanisms and Potential Risks of Engineered Nanoparticles to Plants. *Reviews Env.Contamination (formerly:Residue Reviews)* 261, 5 (2023). <https://doi.org/10.1007/s44169-023-00029-x>

79. Karabasz A, Bzowska M, Szczepanowicz K. Biomedical Applications of Multifunctional Polymeric Nanocarriers: A Review of Current Literature. *Int J Nanomedicine.* 2020 Nov 6;15:8673-8696. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S231477>. .

80. Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials (Basel).* 2015 Jun 30;5(3):1163-1180. doi: <https://doi.org/10.3390/nano5031163>

81. Khasraw M, Bell R, Dang C. Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast*. 2012 Apr;21(2):142-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.12.012> .
82. Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev*. 2011 Mar;40(3):1647-71. doi: <https://doi.org/10.1039/c0cs00018c>
83. Kinghorn AD, EJ DEB, Lucas DM, Rakotondraibe HL, Orjala J, Soejarto DD, Oberlies NH, Pearce CJ, Wani MC, Stockwell BR, Burdette JE, Swanson SM, Fuchs JR, Phelps MA, Xu L, Zhang X, Shen YY (2016) Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin. *Anticancer research* 36 (11):5623-5637. doi: <https://doi.org/10.21873/anticanres.11146>
84. Kitchens K. M., Foraker A. B., Kolhatkar R. B., Swaan P. W., Ghandehari, Endocytosis and Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Caco-2 Cells. *Pharmaceutical Research*, Vol. 24, No. 11, 2007, pp. 2138-2145. doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9415-0>
85. Kobylinska L, Patereha I, Finiuk N, Mitina N, Riabtseva A, Kotsyumbas I, Stoika R, Zaichenko A, Vari SG. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer Nanotechnol*. 2018 9 (1):11. doi: <https://doi.org/10.1186/s12645-018-0045-5>
86. Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Jun;333(3):788-96. doi: <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162321> .
87. Kostiv U., Patsula V., Noculak A., Podhorodecki A., Veřtvičřka D., Poučřková P., et al. Phthalocyanine-conjugated upconversion NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@SiO₂ nanospheres for NIR-triggered photodynamic therapy in a tumor mouse model. *ChemMedChem*. 2017 12, 2066–2073. doi: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700508>

88. Kumar V., Sharma N. & Maitra S.S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. *Int Nano Lett* 7, 243–256 (2017). <https://doi.org/10.1007/s40089-017-0221-3>
89. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Jan 1;75(1):1-18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
90. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
91. Lambert BP, Gillen AJ, Boghossian AA. Synthetic Biology: A Solution for Tackling Nanomaterial Challenges. *J Phys Chem Lett*. 2020 Jun 18;11(12):4791-4802. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c00929>
92. Lao J, Madani J, Puértolas T, Alvarez M, Hernández A, Pazo-Cid R, Artal A, Antón Torres A. Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *J Drug Deliv*. 2013;2013:456409. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/456409> .
93. Li B, Shao H, Gao L, Li H, Sheng H, Zhu L. Nano-drug co-delivery system of natural active ingredients and chemotherapy drugs for cancer treatment: a review. *Drug Deliv*. 2022 Dec;29(1):2130-2161. doi: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2094498>
94. Li Q., Kartikowati C. W., Horie S., Ogi T., Iwaki T., Okuyama K. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. *Sci. Rep*. 2017 7:9894. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09897-5>
95. Lin K., Liu S., Shen Y., Li Q. Berberine attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation. *Inflammation*. 2013 36, 1079–1086. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9640-0>
96. Linhares BG, Linhares DG, Vale RGS. Effects of Physical Exercise and the Use of Doxorubicin on Cardiac Function in Rodents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Cardiol Rev*. 2025 Feb 10. doi: <https://doi.org/10.2174/011573403X328856241219114652>.

97. Liong M., Lu J., Kovoichich M., Xia T., Ruehm S. G., Nel A. E., et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano*. 2008 2, 889–896. doi: <https://doi.org/10.1021/nn800072t>
98. Lippens R. J., Rotteveel J. J., Otten B. J., Merx H. Chemotherapy with Adriamycin (doxorubicin) and CCNU (lomustine) in four children with recurrent craniopharyngioma. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 1998 2, 263–268. doi: [https://doi.org/10.1016/s1090-3798\(98\)80040-8](https://doi.org/10.1016/s1090-3798(98)80040-8).
99. Lippmann M. Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environ Health Perspect.* 1990 Aug;88:311-7. doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.9088311>.
100. Liu H, Li M, Lin Y, You H, Kou J, Feng W. Dual-directional effect of vinorelbine combined with cisplatin or fluorouracil on tumor growth and metastasis in metronomic chemotherapy in breast cancer. *Int J Oncol.* 2024 Feb;64(2):13. doi: <https://doi.org/10.3892/ijo.2023.5601>.
101. Liu H, Zou J, Li X, Ge Y, He W. Drug delivery for platinum therapeutics. *J Control Release.* 2025 Apr 10;380:503-523. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.02.006> . Epub 2025 Feb 11. PMID: 39923853.
102. Liu X, Shan K, Shao X, Shi X, He Y, Liu Z, Jacob JA, Deng L. Nanotoxic Effects of Silver Nanoparticles on Normal HEK-293 Cells in Comparison to Cancerous HeLa Cell Line. *Int J Nanomedicine.* 2021 Feb 3;16:753-761. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S289008>.
103. Lu J-J, Bao J-L, Chen X-P, Huang M, Wang Y-T. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012 (1):485042. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/485042>
104. Mahmoudi M., Laurent S., Shokrgozar M. A., Hosseinkhani M. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Cell “vision” versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano*. 2011 5, 7263–7276. doi: <https://doi.org/10.1021/nn2021088>

105. Mascolo M. C., Pei Y., Ring T. A. Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different base. *Materials*. 2013 6, 5549–5567. doi: <https://doi.org/10.3390/ma6125549>
106. McCarty MF. Nutraceutical, Dietary, and Lifestyle Options for Prevention and Treatment of Ventricular Hypertrophy and Heart Failure. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 24;22(7):3321. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22073321>
107. McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017 Feb;31(1):63-75. doi: <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0> .
108. McGuirk S, Audet-Delage Y, Annis MG, Xue Y, Vernier M, Zhao K, St-Louis C, Minarrieta L, Patten DA, Morin G, Greenwood CM, Giguère V, Huang S, Siegel PM, St-Pierre J. Resistance to different anthracycline chemotherapeutics elicits distinct and actionable primary metabolic dependencies in breast cancer. *Elife*. 2021 Jun 28;10:e65150. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.65150>.
109. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev*. 2004 56, 185–229. doi: <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>
110. Mishra V., Bansal K. K., Verma A., Yadav N., Thakur S., Sudhakar K., et al. Solid lipid nanoparticles: emerging colloidal nano drug delivery systems. *Pharmaceutics*. 2018 10:191. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040191>
111. Mody V. V., Cox A., Shah S., Singh A., Bevins W., Parihar H. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor, *Appl. Nanosci*. 2014 4, 385–392. doi: <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0216-y>
112. Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, Atanasov AG, Bishayee A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *Eur J Pharmacol*. 2019 858:172472. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172472>
113. Mukhopadhyay B, Singh S, Singh A. Utilizing nanomaterials for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Discov Nano*. 2024 Dec 24;19(1):215. doi: <https://doi.org/10.1186/s11671-024-04128-z>

114. Muñoz de Escalona M., Sáez-Fernández E., Prados J. C., Melguizo C., Arias J. L. Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer. *Int. J. Pharm.* 2016 504, 11–19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016>
115. Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 2007 Dec;59(12):752-7. doi: <https://doi.org/10.1080/15216540701736285> .
116. Neag MA, Mocan A, Echeverría J, et al. Berberine: Botanical Occurrence, Traditional Uses, Extraction Methods, and Relevance in Cardiovascular, Metabolic, Hepatic, and Renal Disorders. *Front Pharmacol*. 2018;9:557. Published 2018 Aug 21. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00557>
117. Nedelkoski Z., Kepaptsoglou D., Lari L., Wen T., Booth R. A., Oberdick S. D., et al. Origin of reduced magnetization and domain formation in small magnetite nanoparticles. *Sci. Rep.* 2017 7:45997. doi: <https://doi.org/10.38.srep.45997>
118. Noha A. T. Abbas , Mohammed M. Awad b and Ola E. Nafea c,d*Silymarin in combination with chlorogenic acid modulate hepatotoxicity induced by doxorubicin in rats: possible role of AMPK pathway. *Toxicology Research Journal* 09-Jul-2020 <https://www.nature.com/articles/6605642#Tab1>
119. Noreen S, Maqbool I, Saleem A, Mahmood H, Rai N. Recent insights and applications of nanocarriers-based drug delivery systems for colonic drug delivery and cancer therapy: An updated review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2025 Feb 4;208:104646. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104646>.
120. Owattanapanich W, Owattanapanich N, Kungwankiattichai S, Ungprasert P, Ruchutrakool T. Efficacy and Toxicity of Idarubicin Versus High-dose Daunorubicin for Induction Chemotherapy in Adult Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018 Dec;18(12):814-821.e3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.08.008>.
121. Paiuk O, Mitina NY, Riabtseva A, Haramus V, Dolynska L, Nadashkevych ZY, Zaichenko A. Structure and colloidal-chemical characteristics of polymeric surface active substances based on polyethylene glycol-containing macromeres. *Voprosy khimii*

i khimicheskoi tekhnologii, 2018, No. 6, pp. 63-71. DOI: <https://doi.org/10.32434/0321-4095-2018-121-6-63-71> .

122. Pallichankandy S, Rahman A, Thayyullathil F, Galadari S. ROS-dependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of anti-glioma effect of sanguinarine. *Free Radic Biol Med.* 2015 Dec;89:708-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.404>

123. Palombo M, Deshmukh M, Myers D, Gao J, Szekely Z, Sinko PJ. Pharmaceutical and toxicological properties of engineered nanomaterials for drug delivery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:581-98. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134615>

124. Panchuk R.R.; Boiko N.M.; Lootsik M.D.; Stoika R.S. Changes in cytokine production and morphology of murine lymphoma NK/Ly cells in course of tumor development. *Cent. Eur. J. Biol.* 2007, 2, 71.

125. Panchuk RR, Lehka LV, Terenzi A, Matselyukh BP, Rohr J, Jha AK, Downey T, Kril IJ, Herbacek I, van Schoonhoven S, Heffeter P, Stoika RS, Berger W. Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E. *Free Radic Biol Med.* 2017 May;106:134-147. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.024> .

126. Périgo E. A., Hemery G., Sandre O., Ortega D., Garaio E., Plazaola F., et al. Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl. Phys. Rev.* 2015 2:041302. doi: <https://doi.org/10.1063/1.4935688>

127. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 1977, 83, 346–356.

128. Phaniendra A., Jestadi D. B., Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 2015 30, 11–26. doi: <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>

129. Pillai Gopalakrishna. Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2014 June 27. 1. <https://doi.org/10.15226/2374-6866/1/2/00109>.

130. Pisanti S, Picardi P, D'Alessandro A, Laezza C, Bifulco M. The endocannabinoid signaling system in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2013 May;34(5):273-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.03.003> .
131. Plouffe B. D., Murthy S. K., Lewis L. H. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Rep. Prog. Phys.* 2015 78:016601. doi: <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/1/016601>
132. Poma P, Massaro M, Rigogliuso S, Condorelli L, Sánchez-Espejo R, Viseras C, Notarbartolo M, Riela S. Curcumin and doxorubicin encapsulated in biocompatible clay-based nanomaterial: A strategy to overcome multidrug resistance. *Arch Pharm (Weinheim).* 2025 Jan;358(1):e2400702. doi: <https://doi.org/10.1002/ardp.202400702>
133. Proskauer ES, Weissberger A, Riddick JA, Toops EE. *Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification.* Interscience Publishers, 1955.
134. Qiao JX, Guo DY, Tian H, Wang ZP, Fan QQ, Tian Y, Sun J, Zhang XF, Zou JB, Cheng JX, Luan F, Zhai BT. Research progress of paclitaxel nanodrug delivery system in the treatment of triple-negative breast cancer. *Mater Today Bio.* 2024 Nov 23;29:101358. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101358>
135. Qing Z., Yang P., Tang Q., Cheng P., Liu X., Zheng Y., Liu Y., Zeng J. Isoquinoline Alkaloids and Their Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities and Structure-activity Relationship. *Current Organic Chemistry.* 2017;21(18): 1920-1934 DOI: <https://doi.org/10.2174/1385272821666170207114214> .
136. Rashidi N, Majid Davidson, Vasso Apostolopoulos, Kulmira Nurgali. Nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: Progress, challenges, and opportunities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 95, 2024, 105599, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105599>.
137. Regales L, Gong Y, Shen R, de Stanchina E, Vivanco I, Goel A, Koutcher JA, Spassova M, Ouerfelli O, Mellinghoff IK, Zakowski MF, Politi KA, Pao W. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *J Clin Invest.* 2009 Oct;119(10):3000-10. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI38746> .

138. Riabtseva A, Mitina N, Grytsyna I, Boiko N, Garamus VM, Stryhanyuk H, Stoika R, Zaichenko A. Functional micelles formed by branched polymeric surfactants: Synthesis, characteristics, and application as nanoreactors and carriers. *European Polymer Journal*. 2016 75:406-422. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.01.006>
139. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1458-61. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
140. Rinnerthaler G, Egle D, Bartsch R, Schmitt CA, Petzer A, Balic M, Petru E, Denison U, Singer CF, Bjelic-Radisic V, Gampenrieder SP, Knauer M, Sotlar K, Brunner C, Posch F, Hlauschek D, Sölkner L, Bago-Horvath Z, Filipits M, Gili M, Ritter M, Wieser V, Albertini C, Zaborsky N, Weiss L, Marhold M, Schneeweiss B, Pusch R, Gnant M, Greil R. Neoadjuvant atezolizumab in combination with dual HER2 blockade plus epirubicin in women with early HER2-positive breast cancer: the randomized phase 2 ABCSG-52/ATHENE trial. *Nat Cancer*. 2025 Jan;6(1):41-50. doi: <https://doi.org/10.1038/s43018-024-00890-2>.
141. S'wie'tek M., Brož A., Tarasiuk J., Wronski S., Tokarz W., Koziel A., et al. Carbon nanotube/iron oxide hybrid particles and their PCL-based 3D composites for potential bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C*. 2019a 104:109913. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109913>
142. Salazar J. S., Perez L., de Abril O., Phuoc L. T., Ihiawakrim D., Vazquez M., et al. (2011). Magnetic iron oxide nanoparticles in 10–40 nm range: composition in terms of magnetite/maghemite ratio and effect on the magnetic properties. *Chem. Mater*. 23, 1379–1386. doi: <https://doi.org/10.1021/cm103188a>
143. Senkiv Y.; Riabtseva A.; Heffeter P.; Boiko N.; Kowol C.R.; Jungwith U.; Shlyakhtina Y.; Garasevych S.G.; Mitina N.; Berger W.; et al. Enhanced anticancer activity and circumvention of resistance mechanisms by novel polymeric/phospholipidic nanocarriers of doxorubicin. *J. Biomed. Nanotechnol*. 2014, 10, 1369–1381. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1864>
144. Sharma DK. Recent advancements in nanoparticles for cancer treatment. *Med Oncol*. 2025 Feb 10;42(3):72. doi: <https://doi.org/10.1007/s12032-025-02609-4>

145. Shen, Z., Song, J., Yung, B. C., Zhou, Z., Wu, A., and Chen, X. Emerging strategies of cancer therapy based on ferroptosis. *Adv. Mater.* 2018 30:1704007. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201704007>
146. Singh N, Sharma B. Toxicological Effects of Berberine and Sanguinarine. *Front Mol Biosci.* 2018 5:21. doi: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00021>
147. Skumiel A., Leszczynski B., Molcan M., Timko M. The comparison of magnetic circuits used in magnetic hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* 2016 420, 177–184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.07.018>
148. Steyermark A. *Quantitative Organic Microanalysis*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1961; p. 665.
149. Sueyoshi S, Vitor Silva J, Guizze F, Giarolla J. Dendrimers as drug delivery systems for oncotherapy: Current status of promising applications. *Int J Pharm.* 2024 Sep 30;663:124573. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124573>.
150. Suk J. S., Xu Q., Kim N., Hanes J., Ensign L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2016 99, 28–51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
151. Sultana S, Gupta J, Sharma V, Gupta K, Khosla G, Mishra D. Advanced Engineered Nanoplatfroms to Overcome Biological Barriers for Targeting Brain Tumors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2025 Feb 20. doi: <https://doi.org/10.2174/0115680096355101250120114819>.
152. Summer M, Ashraf R, Ali S, Bach H, Noor S, Noor Q, Riaz S, Khan RRM. Inflammatory response of nanoparticles: Mechanisms, consequences, and strategies for mitigation. *Chemosphere.* 2024 Sep;363:142826. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142826>
153. Sun K., Gao Z., Zhang Y., Wu H., You C., Wang S., et al. (2018). Enhanced highly toxic reactive oxygen species levels from iron oxide core–shell mesoporous silica nanocarrier-mediated Fenton reactions for cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* 6, 5876–5887. doi: <https://doi.org/10.1039/c8tb01731j>
154. Sun L., Liu H., Ye Y. et al. Smart nanoparticles for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* 8, 418 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x>

155. Szumilak M., Wiktorowska-Owczarek A., Stanczak A. Hybrid Drugs—A Strategy for Overcoming Anticancer Drug Resistance?. *Molecules* 2021, 26, 2601. <https://doi.org/10.3390/molecules26092601>
156. Takeuchi H., Kojima H., Yamamoto H., Kawashima Y. Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats. *J Control Release*. 2001 Jul 10;75(1-2):83-91. doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00368-6](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00368-6).
157. Tang S., Peng C., Xu J., Du B., Wang Q., Vinluan RD., Yu M., Kim MJ., Zheng J. Tailoring Renal Clearance and Tumor Targeting of Ultrasmall Metal Nanoparticles with Particle Density. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Dec 23;55(52):16039-16043. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201609043> .
158. Teppo HR, Soini Y, Karihtala P. Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1485283. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/1485283>
159. Theodosis-Nobelos P, Kitiri EN, Christou M, Pantelidou M, Rikkou-Kalourkoti M. Cancer Therapy with Polymeric Nanocarriers and the Transition to Targeted Cancer Therapy: Advances and Future Directions. *Pharm Nanotechnol*. 2025 Feb 4. doi: <https://doi.org/10.2174/0122117385350610250112112855>.
160. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(3):148-54.
161. Torchilin V. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 13, 813–827 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrd4333>
162. Torchilin V. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Disco* 4, 145–160 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
163. Torchilin VP, Levchenko TS, Whiteman KR, Yaroslavov AA, Tsatsakis AM, Rizos AK, Michailova EV, Shtilman MI. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials*. 2001 Nov;22(22):3035-44. doi: [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00050-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00050-3).

164. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 2007 Jan;24(1):1-16. doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9132-0>
165. Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Dec 1;58(14):1532-55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.009>
166. Toy R., Peiris PM., Ghaghada KB., Karathanasis E. Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond).* 2014 Jan;9(1):121-34. doi: <https://doi.org/10.2217/nnm.13.191>.
167. Trousil J., Syrová Z., Dal N.-J. K., Rak D., Konefał R., Pavlova E., et al. (2019). Rifampicin nanoformulation enhances treatment of tuberculosis in zebrafish. *Biomacromolecules* 20, 1798–1815. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00214>
168. Truzzi E., Bongio C., Sacchetti F., Maretti E., Montanari M., Iannuccelli V., et al. Self-assembled lipid nanoparticles for oral delivery of heparin-coated iron oxide nanoparticles for theranostic purposes. *Molecules.* 2017 22:963. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22060963>
169. Urbánek T., Jäger E., Jäger A., Hrubý M. Selectively biodegradable polyesters: nature-inspired construction materials for future biomedical applications. *Polymers.* 2019 11:E1061. doi: <https://doi.org/10.3390/polym11061061>
170. Vale N., Silva S., Duarte D., Crista DMA., Pinto da Silva L., Esteves da Silva JCG. Normal breast epithelial MCF-10A cells to evaluate the safety of carbon dots. *RSC Med Chem.* 2020 Dec 10;12(2):245-253. doi: <https://doi.org/10.1039/d0md00317d>.
171. Van Guyse JFR., Abbasi S., Toh K., Nagorna Z., Li J., Dirisala A., Quader S., Uchida S., Kataoka K. Facile Generation of Heterotelechelic Poly(2-Oxazoline)s Towards Accelerated Exploration of Poly(2-Oxazoline)-Based Nanomedicine. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2024 Jul 1;63(27):e202404972. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.202404972>.
172. Vijay Kumar Thakur, Manju Kumari Thakur Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies: Bioactive and Compatible Synthetic/Hybrid Polymers|.DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119041559>

173. Vila A, Gill H, McCallion O, Alonso MJ. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J Control Release*. 2004 Aug 11;98(2):231-44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.04.026>
174. Voronov SA, Kiselyov EM, Minko SS, Budishevska OG, Roiter YV. Structure and reactivity of peroxide monomers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 1996 34 (12):2507-2511. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19960915\)34:12<2507::AID-POLA24>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19960915)34:12<2507::AID-POLA24>3.0.CO;2-B)
175. Walker PR, Kwast-Welfeld J, Gourdeau H, Leblanc J, Neugebauer W, Sikorska M. Relationship between apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: roles of protein kinase C, tyrosine phosphorylation, and AP1. *Exp Cell Res*. 1993 Jul;207(1):142-51. doi: <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1173> .
176. Wang B, He X, Zhang Z, Zhao Y, Feng W. Metabolism of nanomaterials in vivo: blood circulation and organ clearance. *Acc Chem Res*. 2013 Mar 19;46(3):761-9. doi: <https://doi.org/10.1021/ar2003336>
177. Wang J, Zhao Y, Nie G. Intelligent nanomaterials for cancer therapy: recent progresses and future possibilities. *Med Rev* (2021). 2023 Sep 20;3(4):321-342. doi: <https://doi.org/10.1515/mr-2023-0028>
178. Wang R., Rostyslav S., Li, X. et al. Synthetic and antitumor comparison of 9-O-alkylated and carbohydrate-modified berberine derivatives. *J IRAN CHEM SOC* 17, 3251–3260 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13738-020-01985-0>
179. Whiteman KR, Subr V, Ulbrich K, Torchilin VP. Poly(Hpma)-coated liposomes demonstrate prolonged circulation in mice. *J Liposome Res*. 2001;11(2-3):153-64. doi: <https://doi.org/10.1081/LPR-100108459>.
180. Wick P., Manser P., Limbach LK., Dettlaff-Weglikowska U., Krumeich F., Roth S., Stark WJ., Bruinink A. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 2007 Jan 30;168(2):121-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.019>
181. Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Dec;11(12):3013-69. doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2541>

182. Workman P., Aboagye E., Balkwill F. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 102, 1555–1577 (2010). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642>
183. Wu W., He Q., Jian C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.* 3, 397–415. doi: <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>
184. Wydra R. J., Oliver C. E., Anderson K. W., Dziubla T. D., Hilt J. Z. (2015). Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field. *RSC Adv.* 5, 18888–18893. doi: <https://doi.org/10.1039/C4RA13564D>
185. Xia W.; Tao Z.; Zhu B.; Zhang W.; Liu C.; Chen S.; Song M. Targeted Delivery of Drugs and Genes Using Polymer Nanocarriers for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 9118. <https://doi.org/10.3390/ijms22179118>
186. Xiao D, Liu Z, Zhang S, Zhou M, He F, Zou M, Peng J, Xie X, Liu Y, Peng D. Berberine Derivatives with Different Pharmacological Activities via Structural Modifications. *Mini Rev Med Chem.* 2018;18(17):1424-1441. doi: <https://doi.org/10.2174/1389557517666170321103139>.
187. Xiao H, Wang A, Shuai W, Qian Y, Wu C, Wang X, Yang P, Sun Q, Wang G, Ouyang L, Sun Q. A first-in-class selective inhibitor of ERK1/2 and ERK5 overcomes drug resistance with a single-molecule strategy. *Signal Transduct Target Ther.* 2025 Feb 20;10(1):70. doi: <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02169-z>.
188. Xiao X, Teng F, Shi C, Chen J, Wu S, Wang B, Meng X, Essiet Imeh A, Li W. Polymeric nanoparticles-Promising carriers for cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Oct 7;10:1024143. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1024143>
189. Xuan L, Ju Z, Skonieczna M, Zhou PK, Huang R. Nanoparticles-induced potential toxicity on human health: Applications, toxicity mechanisms, and evaluation models. *MedComm* (2020). 2023 Jul 14;4(4):e327. doi: <https://doi.org/10.1002/mco2.327>

190. Yang H, Shang X, Zhong G, Hong L, Li Z, Zhuang W, Cheng J. Berberine protects human and rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-triggered apoptosis. *Am J Transl Res*. 2021 Feb 15;13(2):659-671. PMID: 33594316; PMCID: PMC7868847.
191. Yu Z.; Shen X.; Yu H.; Tu H.; Chittasupho C.; Zhao Y. Smart Polymeric Nanoparticles in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics* 2023, 15, 775. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030775>.
192. Zeng XH, Zeng XJ, Li YY. Efficacy and safety of berberine for congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2003 Jul 15;92(2):173-6. doi: [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(03\)00533-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(03)00533-2).
193. Zhang M, Cheng S, Jin Y, Zhao Y, Wang Y. Roles of CA125 in diagnosis, prediction, and oncogenesis of ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Apr;1875(2):188503. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188503>.
194. Zhao M., Ding X. F., Shen J. Y., Zhang X. P., Ding X. W., Xu B. Use of liposomal doxorubicin for adjuvant chemotherapy of breast cancer in clinical practice. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2017 18, 15–26. <https://doi:10.1631/jzus.B1600303>
195. Zhijian He, Xiaomeng Wan, Anita Schulz, Herdis Bludau, Marina A. Dobrovolskaia, Stephan T. Stern, Stephanie A. Montgomery, Hong Yuan, Zibo Li, Daria Alakhova, Marina Sokolsky, David B. Darr, Charles M. Perou, Rainer Jordan, Robert Luxenhofer, Alexander V. Kabanov. A high capacity polymeric micelle of paclitaxel: Implication of high dose drug therapy to safety and in vivo anti-cancer activity. *Biomaterials*, Volume 101,2016,Pages 296-309,ISSN 0142-9612,<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.002>.
196. Zhou Q, Guo X, Chen T, Zhang Z, Shao S, Luo C, Li J, Zhou S. Target-specific cellular uptake of folate-decorated biodegradable polymer micelles. *J Phys Chem B*. 2011 Nov 3;115(43):12662-70. <https://doi:10.1021/jp207951e>.
197. Zhu J., Lee H., Huang R., Zhou J., Zhang J., Yang X., Zhou W., Jiang W., Chen S. Harnessing nanotechnology for cancer treatment. *Front Bioeng Biotechnol*. 2025 Jan 20;12:1514890. <https://doi:10.3389/fbioe.2024.1514890>.

198. Zhu L., Zhou Z., Mao H., Yang L. Magnetic nanoparticles for precision oncology: Theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. *Nanomedicine*. 2017 12, 73–87. <https://doi:10.2217/nnm-2016-0316>.
199. Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, Durazzo A, Lucarini M, Eder P, Silva AM, Santini A, Souto EB. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*. 2020 Aug 15;25(16):3731. <https://doi:10.3390/molecules25163731>.
200. Zook JM, Maccuspie RI, Locascio LE, Halter MD, Elliott JT. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology*. 2011 Dec;5(4):517-30. doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.536615>.
201. Западнюк ИП, Западнюк ВИ, Захария ЕА, Западнюк БВ. Лабораторные животные: Рипол Классик; 1983.
202. Стефанов ОВ. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод рекомен. Держ фармакол центр. Київ: Вид. дім «Авіцена». 2001:1-527.

Список публікацій за темою дисертації

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах данихWeb of Science Core Collection та/або Scopus:

(* - рівноцінний вклад у роботу)

1. Panchuk R.*, **Skorokhyd N. ***, Chumak V., Lehka L., Kosiakova H., Horid'ko T., Hudz I., Hula N., Riabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Heffeter P., Berger W., Stoika R. Cannabimimetic N-Stearoylethanolamine as “Double-Edged Sword” in Anticancer Chemotherapy: Proapoptotic Effect on Tumor Cells and Suppression of Tumor Growth versus Its Bio-Protective Actions in Complex with Polymeric Carrier on General Toxicity of Doxorubicin *In Vivo* // *Pharmaceutics*, 2023, 15(3), 835 (**IF – 4.9**, Q1, Pharmacology & Pharmacy). <https://doi: 10.3390/pharmaceutics15030835>.

*– Equal contribution

2. Świątek M., Panchuk R., **Skorokhyd N.**, Černoch P., Finiuk N., Klyuchivska O., Hrubý M., Molčan M., Berger W., Trousil J., Stoika R., Horák D. Magnetic Temperature-Sensitive Solid-Lipid Particles for Targeting and Killing Tumor Cells *Frontiers in Chemistry*. 2020. Vol .8, No. 205. P.1–18 (**IF – 3,8**, Q1)_DOI:[10.3389/fchem.2020.00205](https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00205)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7161697/>

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. **Skorokhyd N.**, Panchuk R., Zaichenko O., Mitina N., Lizhen Wang, Kechun Liu, Meng Jin, Klishch M., Stoika R. Modulating the Biological Effect of Berberine via Its Immobilization on Different Polymer Nanocarriers. *Cytology and Genetics*, 2025, Vol. 59, No. 3, pp. 270-280. (**IF – 0,5**, Q4)

2. Paryzhak S., Dumych T., Zasońska B., Svoboda J., Klyuchivska O., **Skorokhyd N.**, Kozak Y., Horák D., Stoika R. Improvement of hemocompatibility of γ -Fe₂O₃ nanoparticles via their covering with complex poly(N,N-dimethylacrylamide) and SiO₂ shell. *Applied Nanoscience* 13, 7399–7412 (2023). (**IF – 3.869**, Q2) , <https://doi:10.1007/s13204-023-02905-3>.

3. Klishch M., **Skorokhyd N.**, Panchuk R., Stoika R. Biochemical and cellular mechanisms of immunogenic cell death. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2024, 96(6), pp. 5–16 (Q4). doi: <https://doi.org/10.15407/ubj96.06.005>

4. Manko N., Lootsik M., Antonyuk V., Ivasechko I., **Skorokhyd N.**, Kosiakova H., Mehed' O., Horid'ko T., Hula N., Klyuchivska O., Panchuk R., Pokhodylo N., Barabash O., Dumych T., Stoika R. Multifunctional chitosan-based hydrogels: characterization and evaluation of biocompatibility and biodegradability *in vitro*. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2024, 96(1), pp. 80–95 (Q4). doi: <https://doi.org/10.15407/ubj96.01.080>

5. Martínez R., Geronimo B.D., Pastor M., Zapico J.M., Coderch C., Panchuk R., **Skorokhyd N.**, Maslyk M., Ramos A., de Pascual-Teresa B. Multitarget Anticancer Agents Based on Histone Deacetylase and Protein Kinase CK2 inhibitors. *Molecules*. 2020. Vol. 25, No. 7. P. 1497. (IF – 4,2, Q1) DOI: 10.3390/molecules25071497
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7180456/>

6. Kobylinska L., Ivasechko I., **Skorokhyd N.**, Panchuk R., Riabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari S.G. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019. Vol. 14, No. 1. P. 140. (IF – 4,703, Q1)

DOI: [10.1186/s11671-019-2945-7](https://doi.org/10.1186/s11671-019-2945-7)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31016407/>

7. Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Yu. S., Lehka L. V., Moiseenok A. G., Stoika R. S. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential. *Croatian Medical Journal*. 2017. Vol. 58, No 2. P. 171–184. (IF – 1,5, Q2) DOI:10.3325/cmj.2017.58.171

<http://www.cmj.hr/2017/58/2/28409500.htm>

8. Prylutska S., Panchuk R., Gołuński G., Skivka L., Prylutsky Yu., Hurmach V., **Skorokhyd N.**, Borowik A., Woziwodzka A., Piosik J. , Kyzyma O., Garamus V., Bulavin L., Evstigneev M., Buchelnikov A., Stoika R. , Berger W., Ritter U., Scharff P.

C₆₀ fullerene enhances anticancer activity of cisplatin *in vitro* and *in vivo* and facilitates circumvention of drug resistance in tumor cells. *Nano Research*. 2017. Vol. 10, No. 2. P. 652–671 (**IF – 9,6, Q1**)

DOI 10.1007/s12274-016-1324-2

https://www.researchgate.net/publication/309813023_C60_fullerene_enhances_cisplatin_antitumor_activity_and_overcomes_tumor_cell_drug_resistance

9. Purwin M., Hernandez-Toribio J., Panchuk R., **Skorokhyd N.**, Filipiak K., de Pascual-Teresa B., Ramos A. Design and Synthesis of Novel Dual-Target Agents for HDAC1 and CK2 Inhibition. *RSC Advances*. 2016. Vol. 6. P. 66595–66608. (**IF – 3,9, Q2**)

DOI: [10.1039/C6RA09717K](https://doi.org/10.1039/C6RA09717K)

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/RA/C6RA09717K#!divAbstract>

10. Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Y. S., Lehka L. V., Chumak V. V., Omelyanchik S. N., Gurinovich V. A., Moiseenok A. G., Stoika R. S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine decrease the negative side effects of doxorubicin in NL/Ly lymphoma-bearing mice. *Croatian Medical Journal*. 2016. Vol. 57, No 2. P. 180–192. (**IF – 1,624, Q2**) DOI:10.3325/cmj.2016.57.180

<http://www.cmj.hr/2016/57/2/27106359.htm>

11. Kozak Yu. S., Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Lehka L. V., Stoika R. S. Impact of N-acetylcysteine on antitumor activity of doxorubicin and landomycin A in NK/Ly lymphoma-bearing mice. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, No 2. P. 46–54. (**Q4**) DOI:10.15407/ubj90.02.046

<http://ukrbiochemjournal.org/2018/03/impact-of-n-acetylcysteine-on-antitumor-activity-of-doxorubicin-and-landomycin-a-in-nkly-lymphoma-bearing-mice.html>

12. Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Yu. S., Lehka L. V., Moiseenok A. G., Stoika R. S. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-pantethine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential. *Croatian Medical Journal*. 2017. Vol. 58, No 2. P. 171–184. (**IF – 1,5, Q2**) DOI:10.3325/cmj.2017.58.171

<http://www.cmj.hr/2017/58/2/28409500.htm>

13. V. O. Antonyuk, **N. R. Skorohyd**, A. V. Lozynskyi, R. V. Antonyuk, R. B. Lesyk, R. S. Stoika. Use of lectins as vector molecules for delivery of drugs to cells and tissues . *Biopolymers and Cell*. 2019. Vol.35, No. 1. P. 54-63. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000994>

14. Lehka L. V., Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Kozak Y.S., Rohr J., Stoika R. R. Study of inhibition of B16F10 melanoma growth in mice by landomycin A in comparison to doxorubicin. *Studia Biologica*. 2016. Vol. 10, No 1. P. 5–16.

DOI:10.30970/sbi.1001.467

<http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology/article/view/62>

15. Kozak Yu. S., Panchuk R. R., **Skorokhyd N. R.**, Semenovich D. S., Moiseenok A. G, Stoika R. S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine differentially affect doxorubicin's action on glutathione system in human leukemia cells varying in their resistance to chemotherapy in vitro. *Studia Biologica*. 2018. Vol. 12, No 2. P. 13–24
DOI:10.30970/sbi.1202.569

<http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology/article/view/817>

Розділ у монографії

Посилення ефективності дії доксорубіцину його іммобілізацією на полімерному носії, біофункціоналізованому N-стеароїлоетаноламіном / Панчук Р.Р., Чумак В.В., **Скорохід Н.Р.**, Гула Н.М., Гудзь Є.А., Мітіна Н.Є., Заїченко О.С., Стойка Р.С. // Розділ монографії «Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування» / Редкол.: Р.С. Стойка (гол. ред.); НАН України. – К. : Наукова Думка, 2017. – 368 с., 24 с. іл. – С. 97-108.

Основні тези доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких були апробовані результати дисертації (всього тез – 5)

1. **Skorokhyd N.R.**, Panchuk R.R., Kh. Harhay, Mitina N.E. , Zaichenko O.S., Stoika R.S. Novel branched polymer drug carriers containing grafted side polyethylene glycol (mPEG) or polyoxazoline (pOX) chains: biocompatibility in vivo. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 30.

2. Klishch M., **Skorokhyd N.**, Panchuk R., Stoika R. Induction of immunogenic cell death in murine melanoma by a novel thiosemicarbazone derivative. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 84.

3. Думич Т.І., Парижак С.Я., **Скорохід Н.Р.**, Горак Д., Стойка Р.С. Зміна показників крові дослідних тварин за дії NaYF₄:Yb,Er,Pr-вмісних наночастинок. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення та перспективи лектиноморфології» до 70-річного ювілею професора кафедри гістології, цитології та ембріології, Лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Олександра Дмитровича ЛУЦИКА: тези доповідей. (Львів, 10.05.2024). 2024: 52

4. Paryzhak S.Ya., Dumych T.I., **Skorokhyd N.R.**, Horák D., Stoika R.S. Changes in the biochemical and hematological indicators of experimental animals under the influence of NaYF₄:Yb,Er,Pr upconverting nanoparticles. The International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2024). Abstract Book of participants of the International research and practice conference, Uzhhorod National University. (Uzhhorod, Ukraine, 21.08–24.08, 2024) 2024: 286.

5. Paryzhak S., Dumych T., **Skorokhyd N.**, Klyuchivska O., Horák D., Stoika R.S. Biosafety assessment of biosphosphonate-modified polymer-coated NaYF₄:Yb,Er,Pr upconverting nanoparticles: in vitro and in vivo studies. 7th USCB Congress (Львів, 2024) 2024: 86.

Таблиця 8. Характеристика клітинних ліній та відповідних середовищ.

Клітинна лінія	Культуральне середовище
Jurkat (гострий Т-лейкоз людини)	RPMI-1640
HL-60/wt (гострий промієлоцитарний лейкоз людини)	RPMI-1640
HL-60/adr (надекспресія MRP1, резистентність до адріаміцину)	RPMI-1640
HCT 116wt (колоректальна карцинома людини)	RPMI-1640
HCT-116/p53KO (колоректальна карцинома людини з нокаутом гену p53)	RPMI-1640
HeLa (карцинома шийки матки людини)	DMEM
MCF-7 (аденокарцинома молочної залози людини)	DMEM
MDA-MB-231 (аденокарцинома молочної залози людини)	DMEM
SW1573 (карцинома легені людини)	DMEM
SW1573/2R160 (надекспресія Р-глікопротеїну і білка MRT-1)	DMEM

B16F10/wt (високометастатична меланома миші дикого типу)	RPMI-1640
HEK-293 (ембріональна нирка людини)	DMEM
HaCat (кератиноцити людини)	DMEM
MCF-10A (лінія непухлинних епітеліальних клітин людини)	DMEM/Ham's F-12 (GIBCO- Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія) з додаванням 100 нг/мл холерного токсину, 20 нг/мл епідермального фактора росту (EGF), 0,01 мг/мл інсуліну, 500 нг/мл гідрокортизону та 5% обробленої хелексом кінської сироватки.
BALB 3T3 (ембріональні фібробласти миші)	DMEM
L1210 (лейкоз миші)	DMEM

Усі вищезгадані клітинні лінії були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня в рамках білатерального українсько-австрійського проекту «**Механізми цитотоксичної активності ангуциклінового антибіотика ландоміцину Е щодо пухлинних клітин**» (2011-2012)pp.

Синтез матеріалів полімерного носія (PC). Пероксидний мономер 5-трет-бутилперокси-5-метил-1-гексен-3-іну (БЕП) було синтезовано, як описано в роботі (Voropov, S.A., 1996). Після вакуумної перегонки його характеристики були такими: $[O] = 8,7\%$, $d_4^{20} = 0,867$ г/мл, $n_D^{20} = 1,4482$. Гліцидилметакрилат (ГМА) (Merck, Дармштадт, Німеччина) очищали перегонкою у вакуумі. Метиловий ефір полі(етиленгліколю) (mPEG, $M_n = 750$ Da), азобіс(ізобутиронітрил) (AIBN) та етиловий ефірат трифториду бору були отримані від компанії Merck (Дармштадт, Німеччина) і використовувалися без додаткового очищення.

Розчинники етилацетат, діоксан, хлороформ (Chl) та диметилсульфоксид (DMSO) були придбані у Sigma-Aldrich і використовувалися після дистиляції.

Синтез. Гребенеподібний кополімер полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-МПЕГ синтезували в наступному порядку (Riabtseva A, 2016). Спочатку полімер, що містив бічні епоксидні групи, отримували радикальною кополімеризацією БЕП (0,41 г, 2,2 ммоль) і ГМА (7,72 г, 54,4 ммоль) у діоксані (7,9 мл), а як ініціатор використовували AIBN (0,129 г, 0,8 ммоль). Полімеризацію проводили при 343 К до досягнення 65% перетворення мономеру. Для видалення каталізатора (трифторид бору - діетиловий ефір, $BF_3 \cdot OEt_2$) отриманий полімер очищали повторним осадженням з розчину в діоксані в гексан (Braun D, 2005). Потім кополімер використовували як основу для приєднання монозаміщених молекул мПЕГ за допомогою реакцій з бічними епоксидними групами ланок ГМА. Каталізатор трифторид бору (0,27 мл, 0,19 ммоль) і 15 мл розчину мПЕГ (2,5 г, 3,35 ммоль) у діоксані додавали краплями до 20 мл розчину полі(БЕП-ко-ГМА) (1,0 г) у діоксані і перемішували протягом 3 год при 313 К. Залишковий мПЕГ видаляли діалізом з використанням діалізних мішків з розмірами пор MWCO 6-8 кДа (Merck, Дармштадт, Німеччина). Отриманий гребінчастий полімер сушили до постійної маси при кімнатній температурі у вакуумі. Склад полі(БЕП-ко-ГМА)-графт-МПЕГ визначали за допомогою елементного (Steyermark, A., 1961) та функціонального аналізу (Crompton, T.R., 1993). Структура полімеру також була підтверджена за

допомогою ЯМР-спектроскопії. ЯМР-спектри записували в ДМСО-d6 на ЯМР-спектрометрі Bruker AV300 при частоті 300 МГц (Billerica MA, США). Середньочисельну (M_n) та середньозважену (M_w) молекулярну масу визначали за допомогою гелі-проникаючої хроматографії на колонці Styragel HR1 (THF) (Waters GPC/HPLC Instrument, Waters, Milford, MA, USA). Тетрагідрофуран (THF) використовували як елюент, а полістирол з відомою молекулярною масою використовували як стандарт. Швидкість потоку становила 0,5 мл/хв.

N-стеароїлетаноламін і протипухлинний препарат доксорубіцин було іммобілізовано на поверхнево-активних функціональних нанорозмірних полімерних носіях, отриманих на кафедрі органічної хімії Національного Університету «Львівська Політехніка» під керівництвом д.х.н. Заїченка О.С., в рамках наукової співпраці. Нові перспективні олігоперокси (N-вінілпіролідон - 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін – гліцидилметакрилат) були синтезовані шляхом контрольованої полімеризації ненасиченого пероксиду та функційних вінільних мономерів із заданою функціональністю, молекулярно-масовим розподілом, бажаною розчинністю та поверхневою активністю. Основна перевага одержаних олігомерів полягає в поєднанні двох реакційних центрів, а саме: пероксидвмісних фрагментів, здатних до утворення вільних радикалів та епоксидвмісних груп, які забезпечують взаємодію з спиртами, амінами та іншими сполуками, що містять рухливий атом водню. В результаті контрольованої модифікації олігопероксиду N-ацилетаноламінами одержано нові носії, які мали б володіти низькою токсичністю та покращувати дію іммобілізованих на них лікарських речовин (Рис. 38).

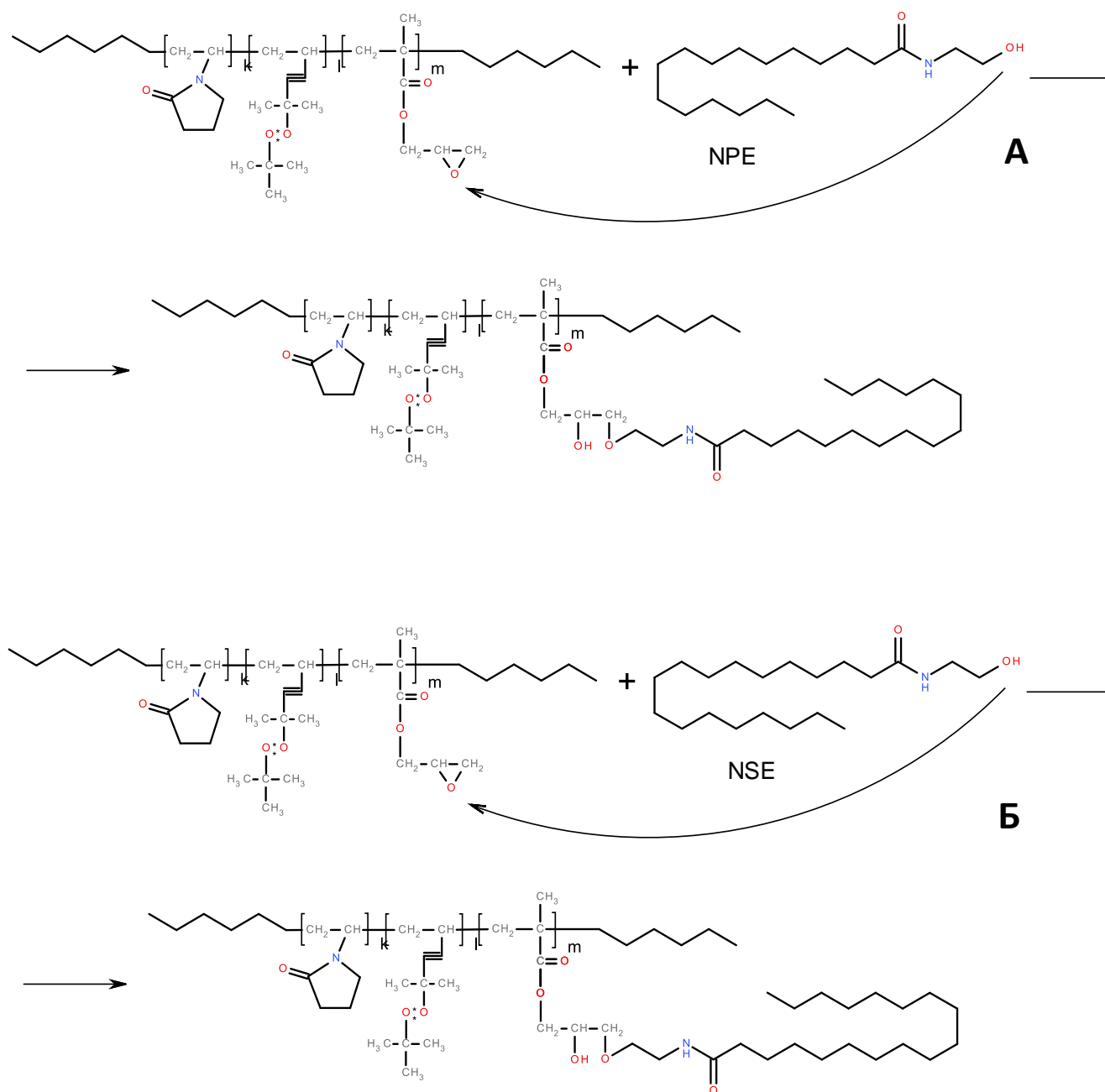


Рис. 38. Механізм взаємодії олігопероксиду з N-пальмітоїлетаноламіном (А) та N-стеароїлетаноламіном (Б).

На основі отриманих носіїв було розроблено нанорозмірні водні системи для доставки доксорубіцину шляхом солюбілізації препарату носієм. Для цього доксорубіцин інкорпоровували у міцелу, утворену полімерним носієм, шляхом переведення його з органічного середовища у водний розчин.

Оскільки доксорубіцин містить хромофорну групу, здатну флуоресцювати при довжині хвилі 570 нм, це дає змогу аналізувати структуру та розподіл нанокompatитних носіїв за допомогою флуоресцентної мікроскопії. На Рис. 62 показано вигляд нанокompatитів з іммобілізованим NSE та доксорубіцином, а також їхній розподіл за розміром. Отримані нанокompatити виявилися стабільними у водних розчинах і зберігають свою активність протягом тривалого часу (понад 2 місяці).

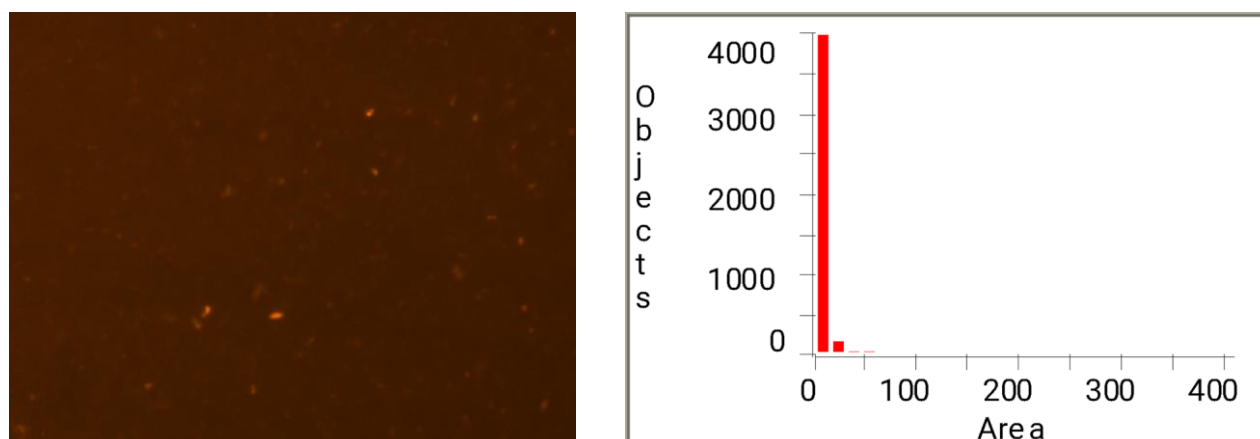


Рис. 39. Загальний вигляд наночастинок полімерного носія на основі полімерного носія N-вінілпіролідон-5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-гліцидил-метакрилату з іммобілізованими доксорубіцином та NSE в розчині (А) та гістограма їх розподілу за розміром (Б)

Синтез полімерних носіїв

Для синтезу гребенеподібних полімерних носіїв (ПН) використовували дві синтетичні стратегії: 1) прищеплення монометилового ефіру ПЕГ (мПЕГ) або поліетилноксазоліну (пЕтОх) до епоксид-вмісного полімеру (grafting to) (Kobylnska L, 2018) і 2) (ко)полімеризація макромерів ПЕГ-метакрилату (grafting through) (Paiuk O, 2018).

Матеріали для синтезу ПН: мономер гліциділметакрилат (ГМА) (Merck, США), N-вініл-2-піролідон (NBP) (Sigma-Aldrich) і диметилмалеїнат (ДММ) (Acros) очищали перегонкою в вакуумі. Макромер поліетиленгліколь метиловий етер метакрилат (ПЕГМА, $M_n = 475$ Да), монометиловий етер поліетиленгліколю (мПЕГ, $M_n = 550$ Да), азобісізобутиронітрил (АІБН), етилетиракт трифториду бору (Merck, США) використовувалися без додаткового очищення. Всі розчинники були отримані від Хімлаборреактив (Київ, Україна) і використовували після додаткового очищення (Proskauer et al. 1955). Пероксидний мономер 5-*трет*-бутилперокси-5-метил-1-гексен-3-ін (БЕП) був синтезований за відомою методикою (Voronov SA, 1996). Поліетилноксазолін (пЕтОх) із молекулярною масою 2000 Да був отриманий за допомогою методу РОП-полімеризації мономеру 2-етил-2-оксазоліну (Sigma-Aldrich) за відомою методикою (Dworak et al. 2014).

Синтез полімерних носіїв:

1) Гребенеподібний кополімер *полі(БЕП-ГМА)-графт-мПЕГ (PC-PEG)* та *полі(БЕП-ГМА)-графт-пЕтОх (PC-pEtOx)* синтезували в дві стадії. Спочатку методом радикальної кополімеризації мономерів БЕП (0,41 г, 2,2 ммоль) і ДМА (7,72г, 54,4 ммоль) в діоксані (7,9 мл) був отриманий епоксидовмісний полімер, ініціатором радикало-утворювання був АІБН (0,129 г, 0,8 ммоль), полімеризацію проводили при 343 К до досягнення максимальної конверсії 65%. Отриманий полімер очищали переосадженням (Dietrich B, 2013). Після цього ко-полімер використовували як основу для одержання ПЕГ-вмісного та поліоксазолін-вмісного гребенеподібних кополімерів. Синтез PC-PEG проводили наступним

чином: до 20 мл розчину полімеру (ВЕР-ко-ГМА) (1,0 г) в діоксані додавали етилетира́т трифториду бору (0,027 мл, 0,19 ммоль), а потім краплями додавали 15 мл розчину мПЕГ (2,5 г, 4,35 ммоль) в діоксані і перемішували протягом 3 годин при 313К. Синтез РС-рЕтОх здійснювали за аналогічною методикою щодо прищеплення ланок ПЕГ: поліети́локсазолін перед проведенням синтезу сушили під вакуумом при 313К 24 години, потім до 20 мл розчину пол(ВЕР-ко-ГМА) (1,0 г) в хлористому метиле́ні додавали етилетира́т трифториду бору (0,013 мл, 0,08 ммоль), а потім додавали 15 мл розчину пЕеОх (6,5 г, 3,25 ммоль) в хлористому метиле́ні і перемішували протягом 3 годин при 313К (Riabtseva et al., 2016). Незв'язаний мПЕГ пЕтОх видаляли діалізом, використовуючи для цього діалізні мішки з розміром пор MWCO 6-8 кДа (Merck, США) і потім сушили при кімнатній температурі в вакуумі. Структуру отриманих ко-полімерів підтверджували, використовуючи метод ЯМР спектроскопії та аналіз на функціональні групи.

2) Гребенеподібний полі(ПЕГМА-ко-ДММ) синтезували в діоксані, використовуючи методом радикальної ко-полімеризації ПЕГ-вмісного макромеру та ДММ, полімеризацію ініціювали АІБН за присутності ІПБ, як регулятора довжини полімерного ланцюга. Для синтезу полі(ПЕГМА-ко-ДММ) готували суміш ПЕГМА (3,8 мл, 8,0 ммоль) і ДММ (0,13 мл, 0,9 ммоль), до отриманої суміші додавали АІБН (0,1 г, 0,61 ммоль) в діоксані. Синтез проводили при 333 К, до конверсії мономерів 65% (Dietrich B, 2013). Отриману суміш багаторазово переосажували в гексані. Синтезовані полімери очищали від макромерів дробним осадженням і сушили в вакуумі до постійної ваги (Francuskiiewicz F, 2013).

Матеріали.

FeCl_2 - $4\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 - $6\text{H}_2\text{O}$, 1-тетрадеканол (TD) та всі інші хімічні реактиви були придбані у Sigma- Aldrich (Сент-Луїс, штат Мічиган, США). 25 % NH_4OH , 70% олеїнову кислоту (ОК), дихлорметан (ДХМ) та метиленхлорид було отримано від Lach-Ner (Нератовіце, Чеська Республіка). Полі(етиленоксид)-блок-полі(ϵ -капролактон) (BL; M_n = 6500 Да, M_w = 7100 Да, полідисперсність = 1,1) синтезували шляхом полімеризації ϵ -капролактону з розкриттям кільця, ініційованої монометилловим ефіром полі(етиленоксиду) (ступінь полімеризації = 45), як описано раніше (Trousil J, 2019). Ультраристу воду для синтезу магнітних частинок отримували з системи Milli-Q Gradient A10 (Millipore; Molsheim, Франція).

Характеристика частинок.

Просвічуючу електронну мікроскопію використовували для вимірювання середньочислового діаметра частинок (D_n) і розподілу частинок за розмірами (дисперсність D) за допомогою мікроскопа Fei Tecnaï G2 Spirit TEM (Брно, Чеська Республіка). Розмір mag.SLPs оцінювали за допомогою скануючого електронного мікроскопа MAIA3 (Tescan; Брно, Чеська Республіка). Динамічне розсіювання світла (DLS) водних дисперсій SLP (25°C) на Zen 3600 Zetasizer (Malvern Instruments; Malvern, Великобританія) використовували для визначення ζ -потенціалу, гідродинамічного діаметра (D_h) та індексу полідисперсності (PDI) за кривою розподілу інтенсивності. Вміст феруму визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрометра Perkin Elmer 3110 (AAS; Waltham, MA, USA), вміст C вимірювали на елементному аналізаторі FlashSmart TM (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA), а термогравіметричний аналіз проводили в потоці повітря зі швидкістю нагрівання 10°C/хв на термогравіметричному аналізаторі Perkin Elmer TGA 7 (Waltham, Массачусетс, США), оснащений програмним забезпеченням Pyris. Тепловий ефект mag.SLP перевірявся в змінному магнітному полі (AMF) за допомогою саморобної системи змінного струму, а зміни температури

відстежувалися за допомогою оптоволоконного датчика температури (FISO Technologies; Квебек, Канада) (Skumiel A, 2016). Намагніченість сухих частинок визначали за допомогою вібраційного магнітометра зразка EV9 (DSM Magnetics, ADE Corp.; Лоуелл, Массачусетс, США) при кімнатній температурі.

Таблиця 9. Склад і властивості частинок.

es	Particl	C (wt.%)	Fe (wt.%)	D_h (nm)	PDI	ζ -potential (mV)	M_s (A·m ² /kg)	M_r (A·m ² /kg)	H_c (Oe)
	IO	–	73.1	150	0.17	14	53.1	0.9	.5
	IO-OA	2.5	67.1	244	0.33	15	49.8 ^a	0.9 ^a	.9 ^a
	SLPs	73.5	–	866	0.48	–30	–	–	
Ps	Mag.SL	69.7	5.6	854	0.59	–37	3.6	0.1	.3

^a – в дисперсії, підготовленій за допомогою дихлорметану (DCM). Кінцевий об'єм водної дисперсії SLP становив 5 мл, магнітні SLPs містили 20 мг оксиду феруму.

IO - оксид феруму; IO-OA – оксид феруму, стабілізований олеїною кислотою; SLPs – тверді ліпідні частинки; mag.SLPs – магнітні тверді ліпідні частинки; D_h - гідродинамічний діаметр (DLS); PDI – індекс полідисперсності (DLS); M_s – намагніченість насичення; M_r – залишкова намагніченість; H_c – коерцитивність.

Магнітний компонент термочутливих твердо-ліпідних частинок був створений на основі співосаджених наночастинок IO, які є полідисперсними, мають сферичну форму та розмір, що залежить від таких параметрів, як температура, швидкість перемішування, тип солей феруму та ін. (Wu W, 2008). Частинки з діаметром, близьким до синтезованого в цій роботі ($D_n = 10$ нм), вже були описані іншими авторами (Salazar JS, 2011; Fang M, 2012; Mascolo MC, 2013). Суттєва різниця між D_n і D_h (150 нм) зумовлена кількома факторами, зокрема внеском сольватаційного шару у величину D_h , відсутністю стеричної стабілізації, що призводить до агрегації, та чутливістю ДЛС до присутності великих частинок. Відносно низький ζ -потенціал (14 мВ) вказує на низьку стабільність МО у воді. Незначна втрата маси в ТГА пояснюється випаровуванням залишкової води.

Загалом магнітні властивості наночастинок тісно пов'язані з їхнім хімічним складом, розміром, морфологією та кристалічністю (Li Q, 2017). Зі зменшенням розміру багатодоменні структури стають однодоменними, а потім, після досягнення критичного діаметра, суперпарамагнітними. Суперпарамагнетизм є бажаною властивістю наночастинок, призначених для біомедичного застосування, оскільки вони не агрегуються за відсутності зовнішнього магнітного поля. Однак на розділення частинок магнітом це не впливає. Незначна залишкова намагніченість і коерцитивність свідчать про те, що ІО є сумішшю суперпарамагнітних і феромагнітних частинок ($>12,5$ нм) (Kafrouni L, 2016). Намагніченість насичення наночастинок ІО була нижчою, ніж у об'ємного ІО ($M_s = 76$ і 92 А-м²/кг для γ -Fe₂O₃ і Fe₃O₄, відповідно) (Berkowitz AE, 1968), але достатньою, щоб забезпечити відмінну маніпуляцію магнітним полем. Погіршення магнітних параметрів, особливо намагніченості насичення, може бути спричинене змішаним хімічним складом різних оксидів, а також наявністю протифазних доменних граничних структурних дефектів (Nedelkoski Z, 2017).

Успішне покриття ІО оксидом феруму було підтверджено кількома методами, наприклад, наявністю гало-шару навколо наночастинок за допомогою ТЕМ-мікрофотографії, збільшенням D_h за допомогою DLS та наявністю карбону в частинках ІО-ОА за допомогою елементного аналізу. Збільшення PDI вказує на агрегацію частинок і обмежену здатність ОА стабілізувати їх у воді. Однак слід зазначити, що первинним наміром введення шару ОА була стабілізація частинок ІО в ДКМ, а не у воді. Крім того, шар оксиду нітрогену може бути частково пошкоджений під час перенесення частинок ІО-ОА з органічної фази у водну через суміші етанол/вода. Кількість ОА в частинках ІО-ОА, розрахована за допомогою ТГА та елементного аналізу, становила 7,1 та 3,3 мас. %, відповідно. Крім того, нижча намагніченість насичення ІО-ОА порівняно з частинками ІО (на $3,3$ А-м²/кг) також зумовлена наявністю оболонки ОА на ядрі частинок. Порівнюючи намагніченості насичення гідрофільного ІО та гідрофобного ІО-ОА, було розраховано, що кількість покриття ОА становить 6,1 мас. %.

У mag.SLPs ТД формував ліпідну матрицю, яка містила ІО-ОА для надання частинкам магнітних властивостей. Хороша сумісність між ліпідною матрицею і ІО-ОА забезпечувала однорідний розподіл магнітних наночастинок в об'ємі SLP, що є важливим фактором для запобігання вивільнення і можливої місцевої токсичності, яка є несприятливою як з терапевтичної, так і з економічної точки зору (Huang X, 2001). Як варіант, прискорення плавлення матриці, а отже, вивільнення ІО-ОА в цільовому місці, може бути досягнуто шляхом локального нагрівання, спричиненого впливом АМФ. Біосумісний і біодеградуєчий БЛ (Trousil J, 2019; Urbánek T, 2019) використовували для стабілізації СЛП і одночасно для забезпечення покриття, здатного зменшити потенційне поглинання ретикулоендотеліальною системою. Модифікація поверхні частинок полі(етиленоксидом) є добре відомим підходом для ефективного подовження їх системної циркуляції шляхом обмеження агрегації частинок, опсонізації та поглинання шляхом фагоцитозу (Suk JS, 2016).

Як SLPs, так і mag.SLPs характеризуються подібними значеннями D_h , що вказує на те, що включення наночастинок ІО-ОА в ліпідний матрикс не впливає на розмір ліпідних частинок, проте ζ -потенціал mag.SLPs є дещо нижчим. Подібно до результатів, отриманих для наночастинок ІО, було відмічено значну різницю між D_h та D_n , визначеними за допомогою СЕМ-мікрофотографій (854 проти 70-90 нм), що може бути зумовлено тими ж причинами, що й описані вище. Як розмір, так і ζ -потенціал частинок є важливими параметрами, що визначають їх доставку та біорозподіл.

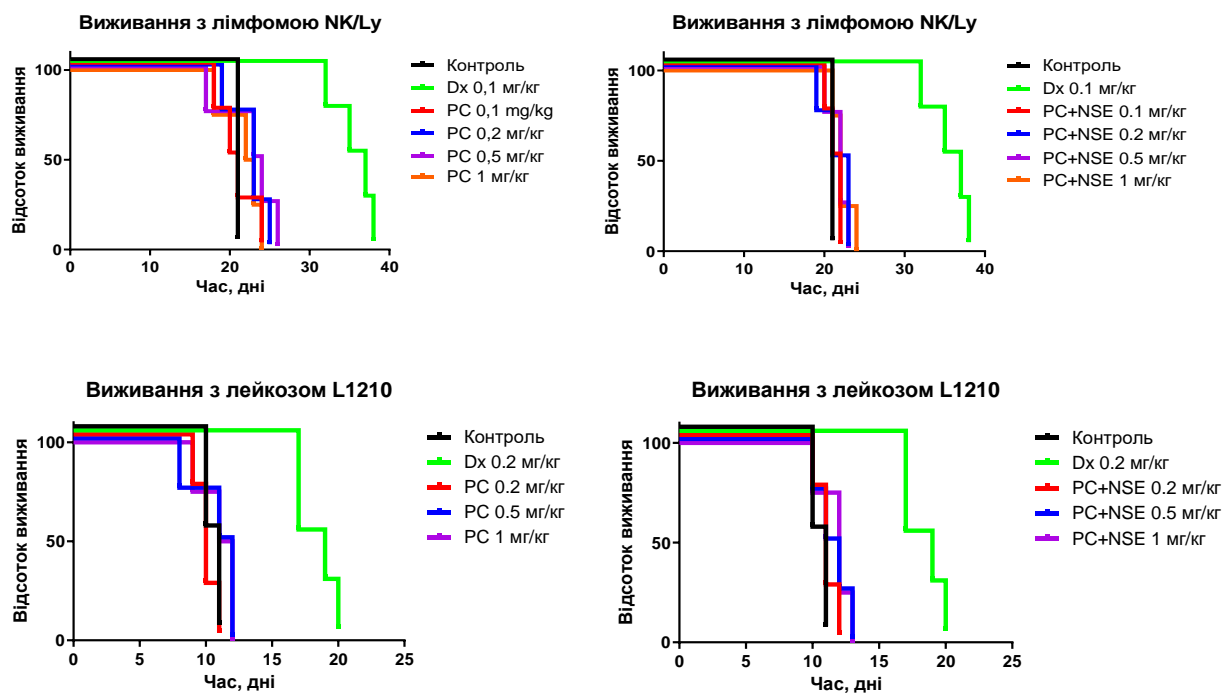


Рис. 40. Порівняння терапевтичної активності ПК та ПК-NSE у різних дозах (еквівалентних тим дозам ПК і ПК-NSE, що використовуються для введення 0,1 мг/кг – 1мг/кг Dx) щодо тварин з лімфомою NK/Ly (A) та лейкозом L1210 (B), відповідно.

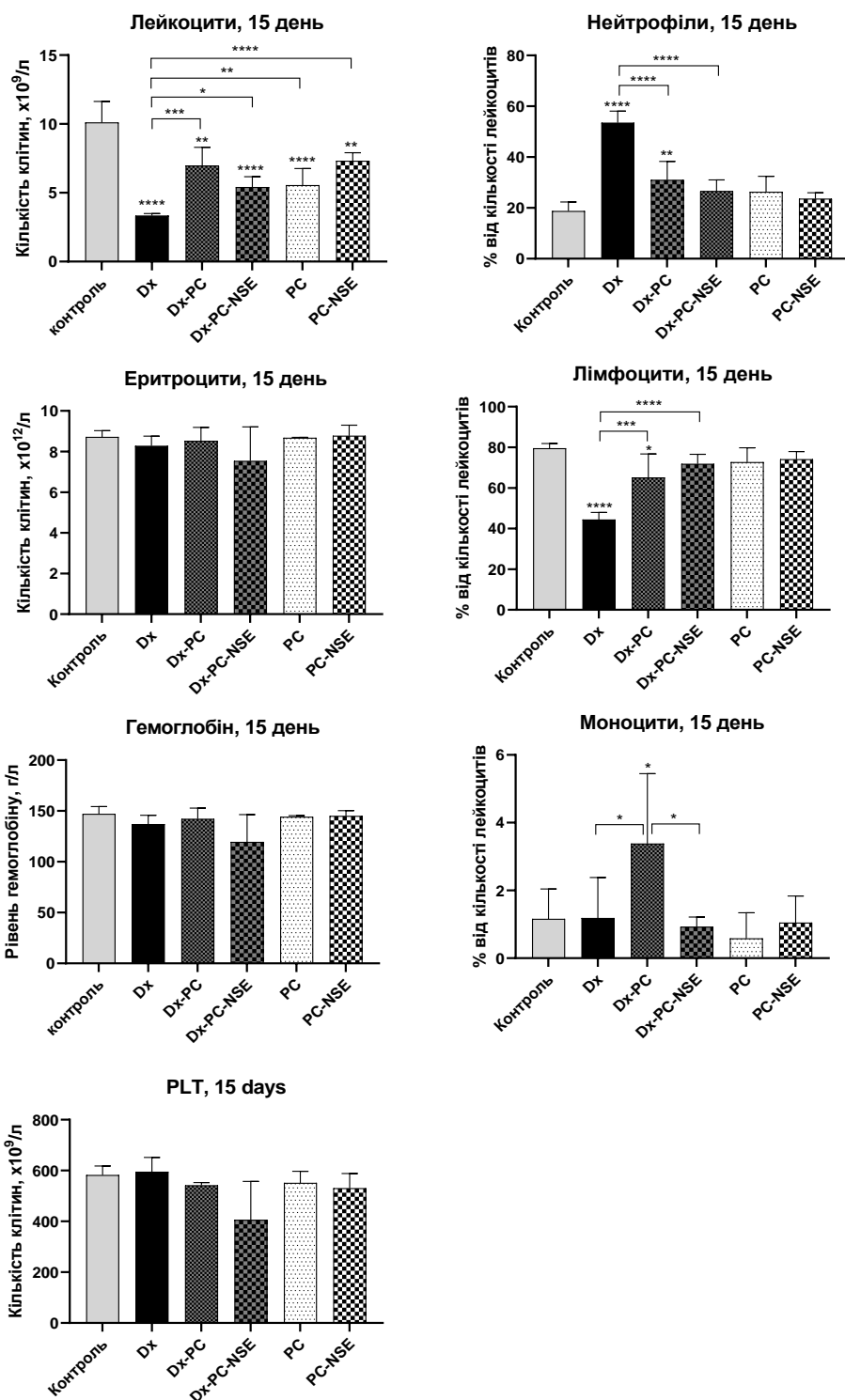


Рис. 41. Зміни гематологічного профілю у мишей лінії Balb/c після введення сублетальної дози Dx (20 мг/кг), Dx-PC та Dx-PC-NSE (n = 5). Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього ANOVA та тесту тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

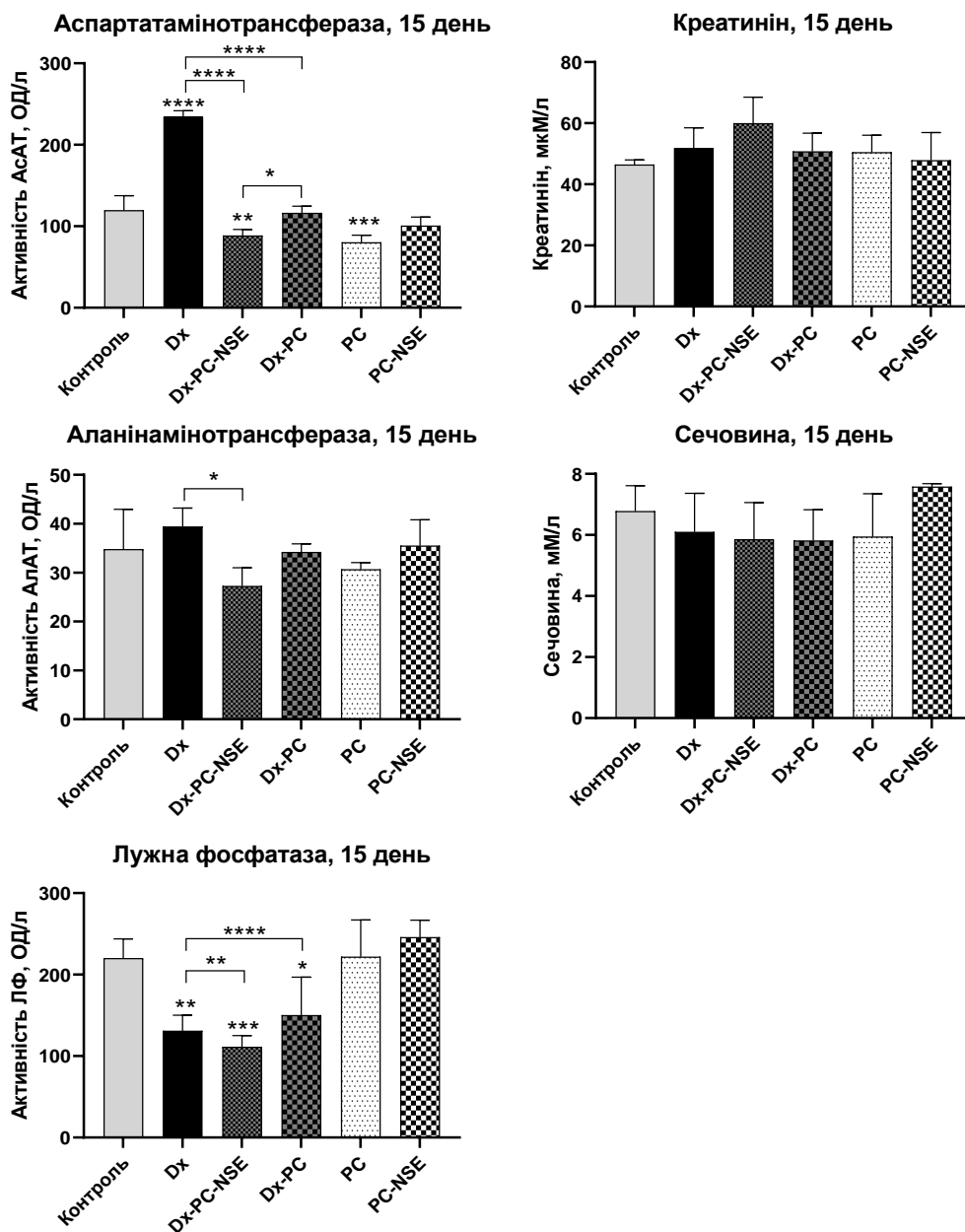


Рис. 42. Зміни маркерів гепато- та нефротоксичності у мишей лінії Balb/c після введення сублетальної дози Dx (20 мг/кг), Dx-PC та Dx-PC-NSE (n = 5). Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

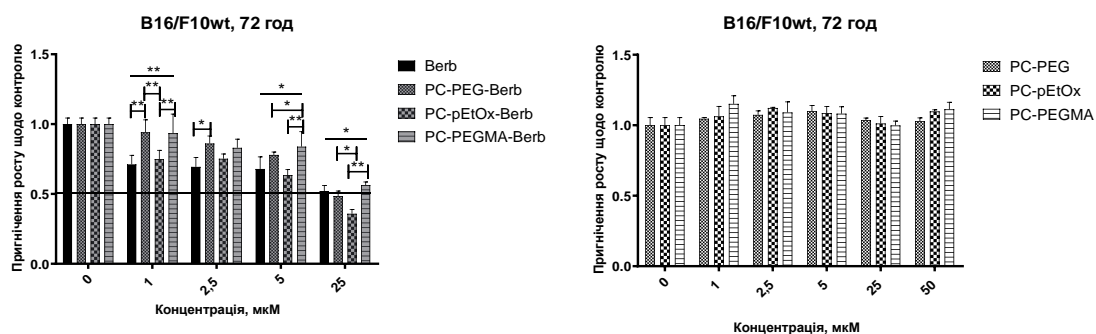
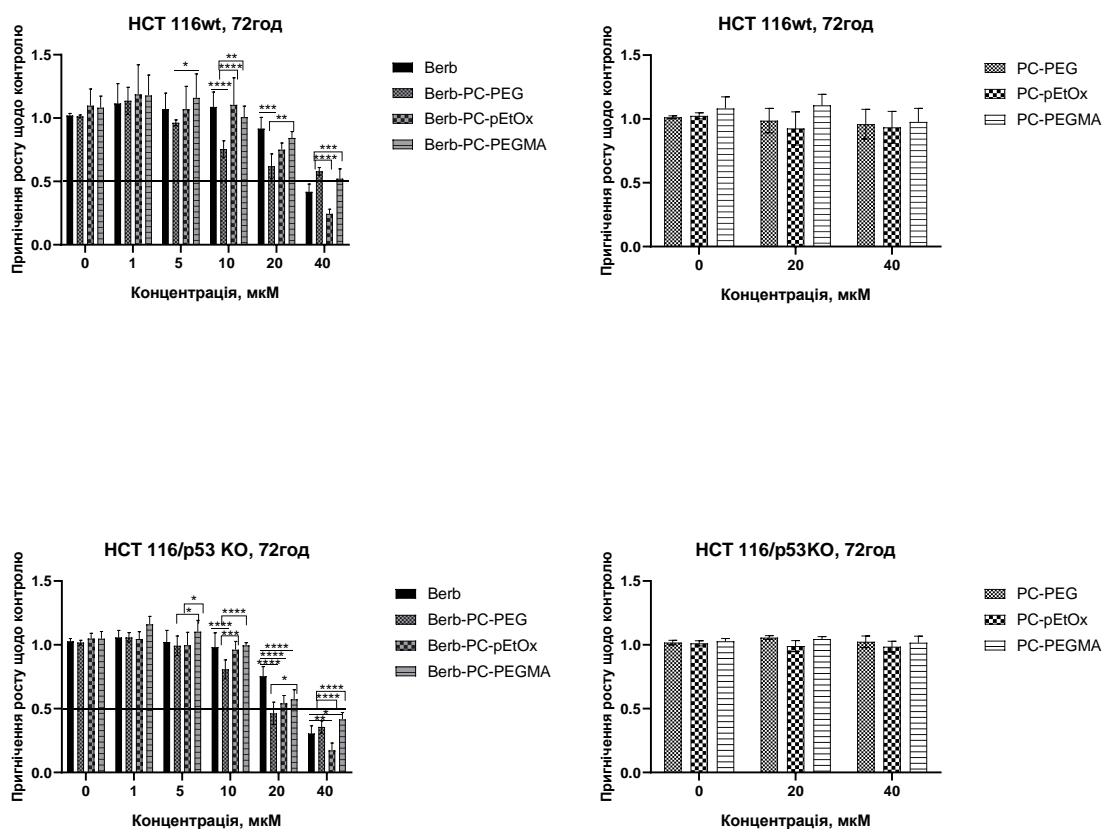


Рис. 43. Результати вивчення цитотоксичної дії берберину, його комплексів, іммобілізованих на носіях, та нативних полімерних носіїв щодо клітин мишачої меланоми B16/F10. МТТ-тест, 72 години інкубації (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)



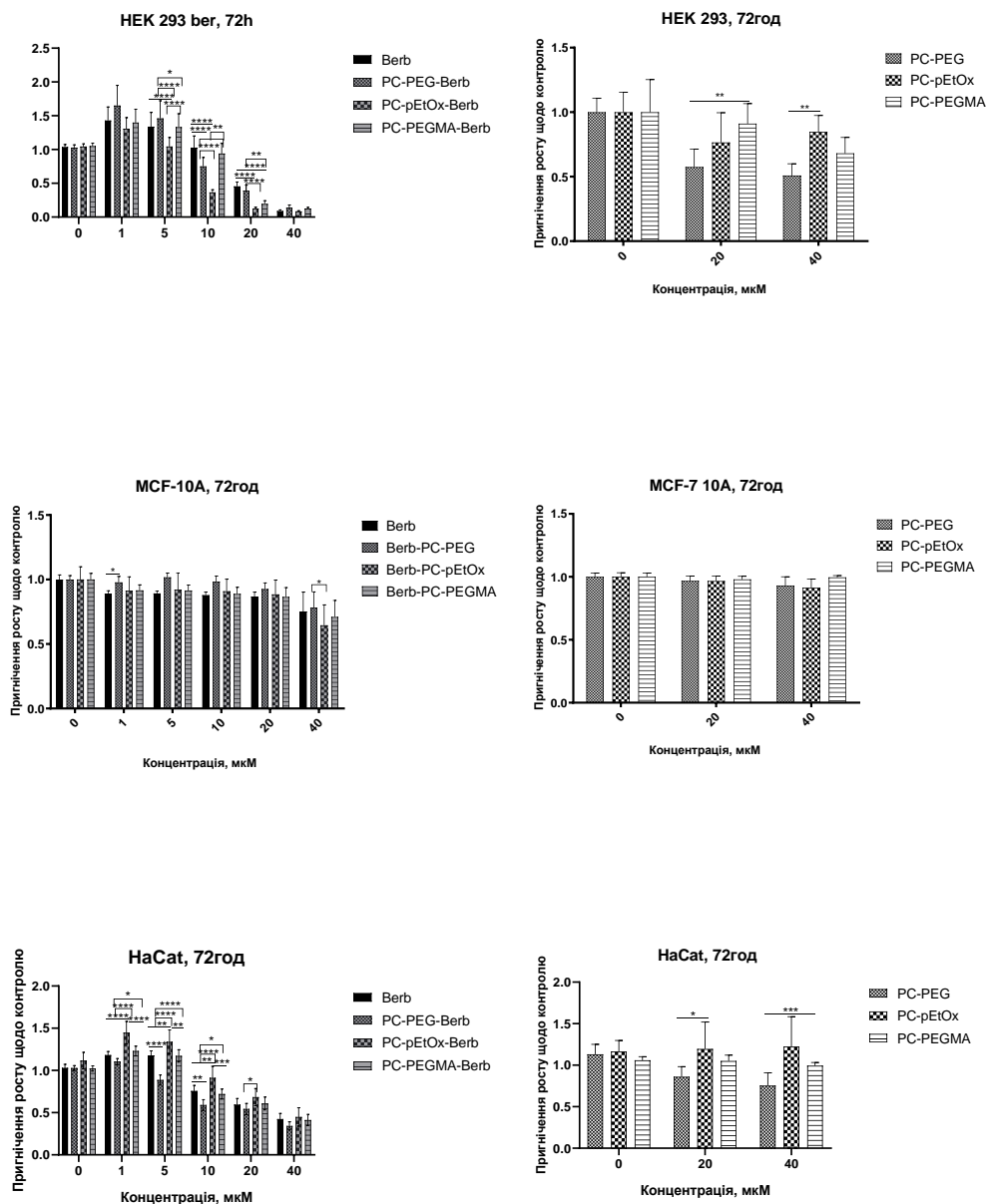


Рис. 44. Порівняння цитотоксичної активності *in vitro* берберину та його кон'югатів з різними полімерними носіями щодо різних типів пухлинних та псевдонормальних клітин ссавців. МТТ-тест, 72 години інкубації. * – $P < 0.05$, ** – $P < 0.01$, *** – $P < 0.001$

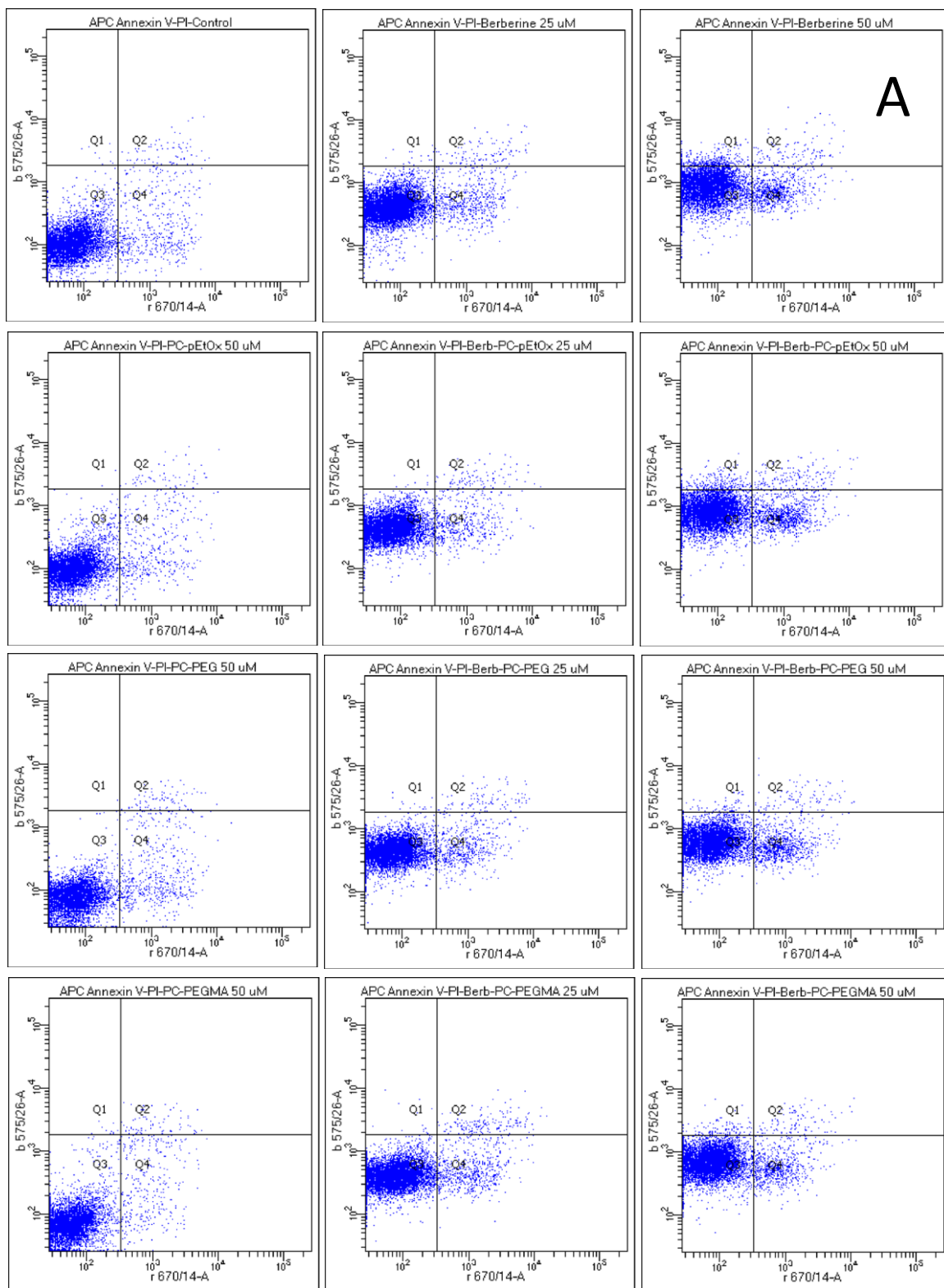


Рис. 45. Порівняння проапоптичної активності берберину та його кон'югатів на різних полімерних носіях щодо клітин карциноми товстої кишки людини лінії НСТ-116. Інкубація – 24 години, подвійне забарвлення APC-міченим анексином V та пропідію йодидом, проточна цитофлуориметрія.

А. Гістограми розподілу клітинних популяцій. Q1 – AnV(-)/PI(+) – некротичні клітини, Q2 – AnV(+)/PI(-) – ранньо-апоптичні клітини, Q3 – AnV(-)/PI(-) – інтактні клітини, Q4 – AnV(+)/PI(+) – пізньо-апоптичні клітини

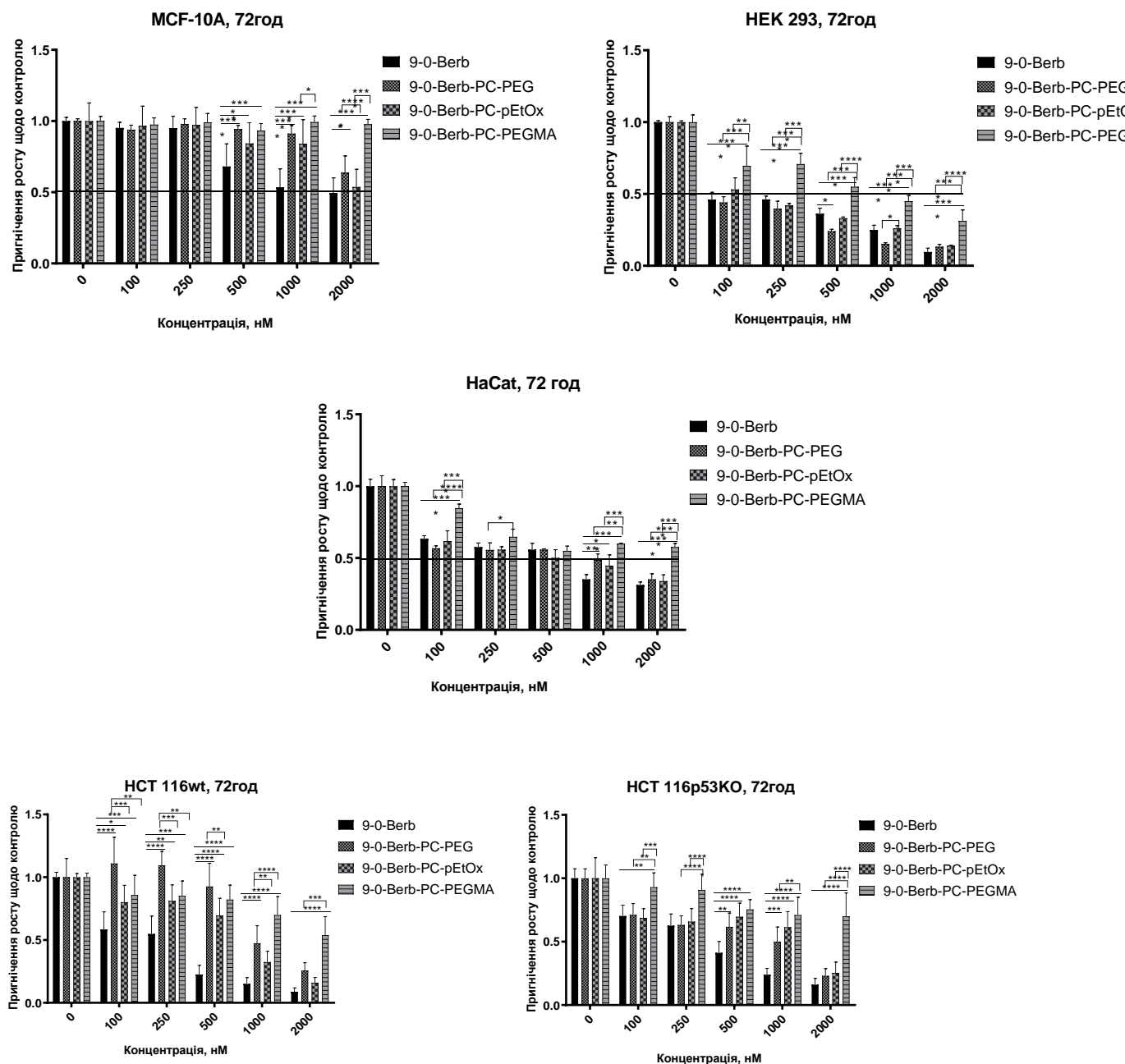


Рис. 46. Порівняння цитотоксичної активності 9-О-октил-берберину та його кон'югатів з різними полімерними носіями *in vitro* щодо різних типів пухлинних та псевдонормальних клітин ссавців. МТТ-тест, 72 години інкубації. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

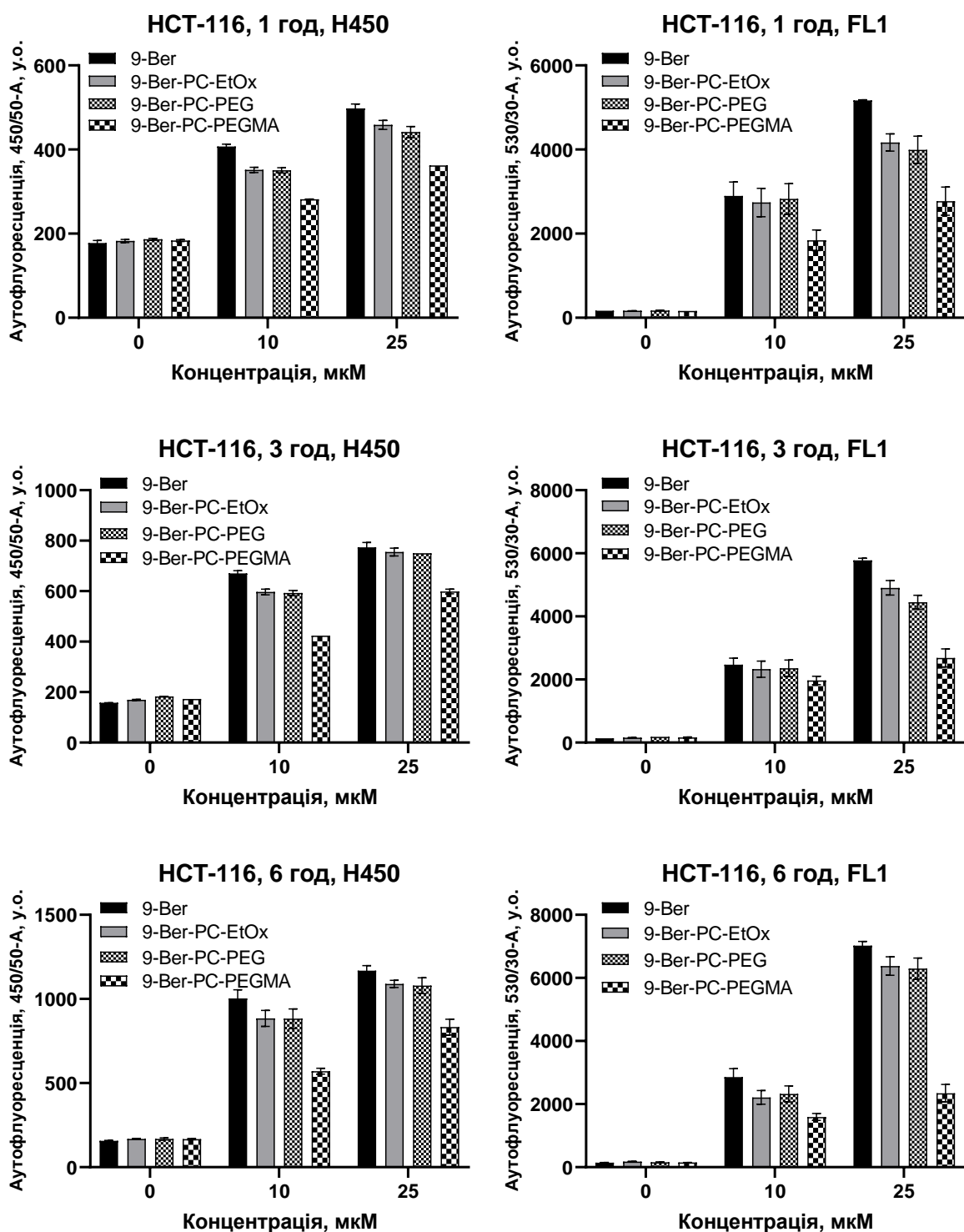


Рис. 47. Часозалежний аналіз проникнення 9-О-октил-берберину у вільній формі, та іммобілізованого на полімерних носіях з фрагментом полі-2-оксазоліну (PC-pEtOx), ПЕГ 5000 (PC-PEG) та гліцидилметакрилату (PC-PEGMA) у клітини карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116. Проточна цитофлуориметрія, канали Horizon 450 (450 нм) та FL1 (530 нм), 1, 3, 6 год інкубації

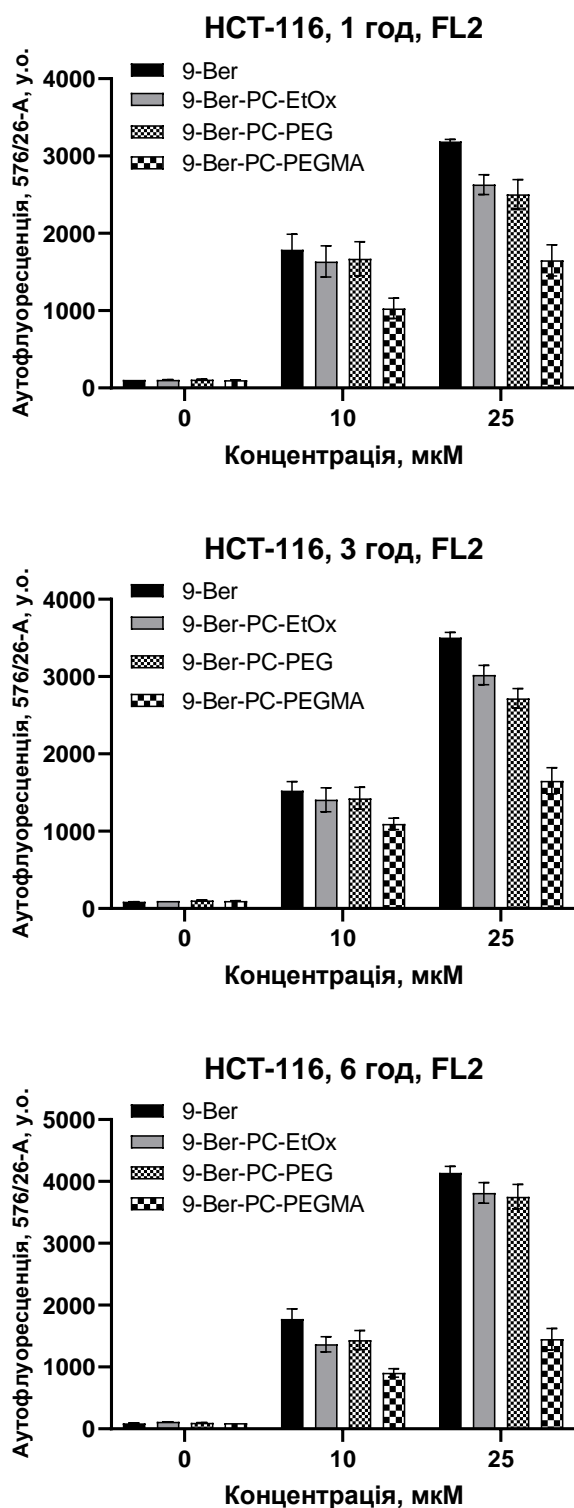


Рис. 48. Часозалежний аналіз проникнення 9-О-октил-берберину у вільній формі, та іммобілізованого на полімерних носіях з фрагментом полі-2-оксазоліну (РС-рEtOx), ПЕГ 5000 (РС-PEG) та гліцидилметакрилату (РС-PEGMA) у клітини карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116. Проточна цитофлуориметрія, канал FL2 (576 нм), 1, 3, 6 год інкубації.

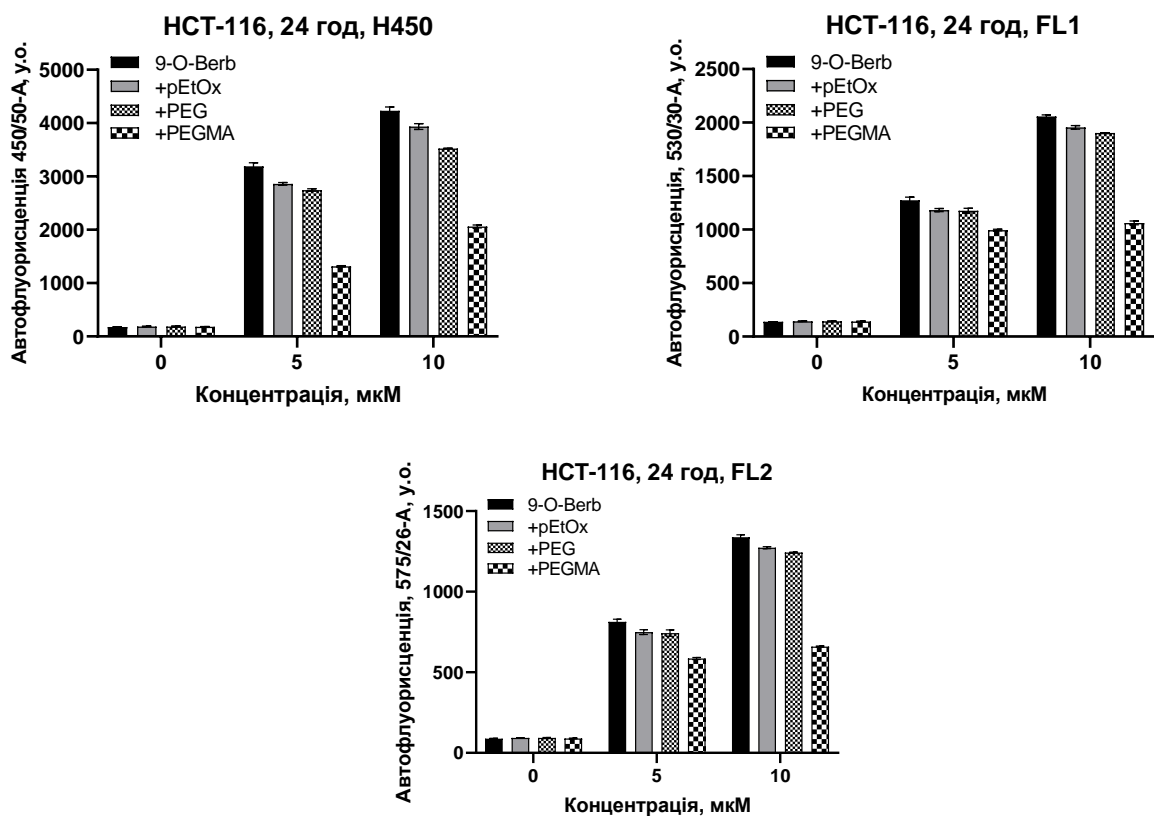


Рис. 49. Часозалежний аналіз проникнення 9-О-октил-берберину у вільній формі, та іммобілізованого на полімерних носіях з фрагментом полі-2-оксазоліну (РС-pEtOx), ПЕГ 5000 (РС-PEG) та гліцидилметакрилату (РС-PEGMA) у клітини карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116. Проточна цитофлуориметрія, канали Horizon 450 (450 нм) , FL1 (530 нм), канал FL2 (576 нм), 24 год інкубації.

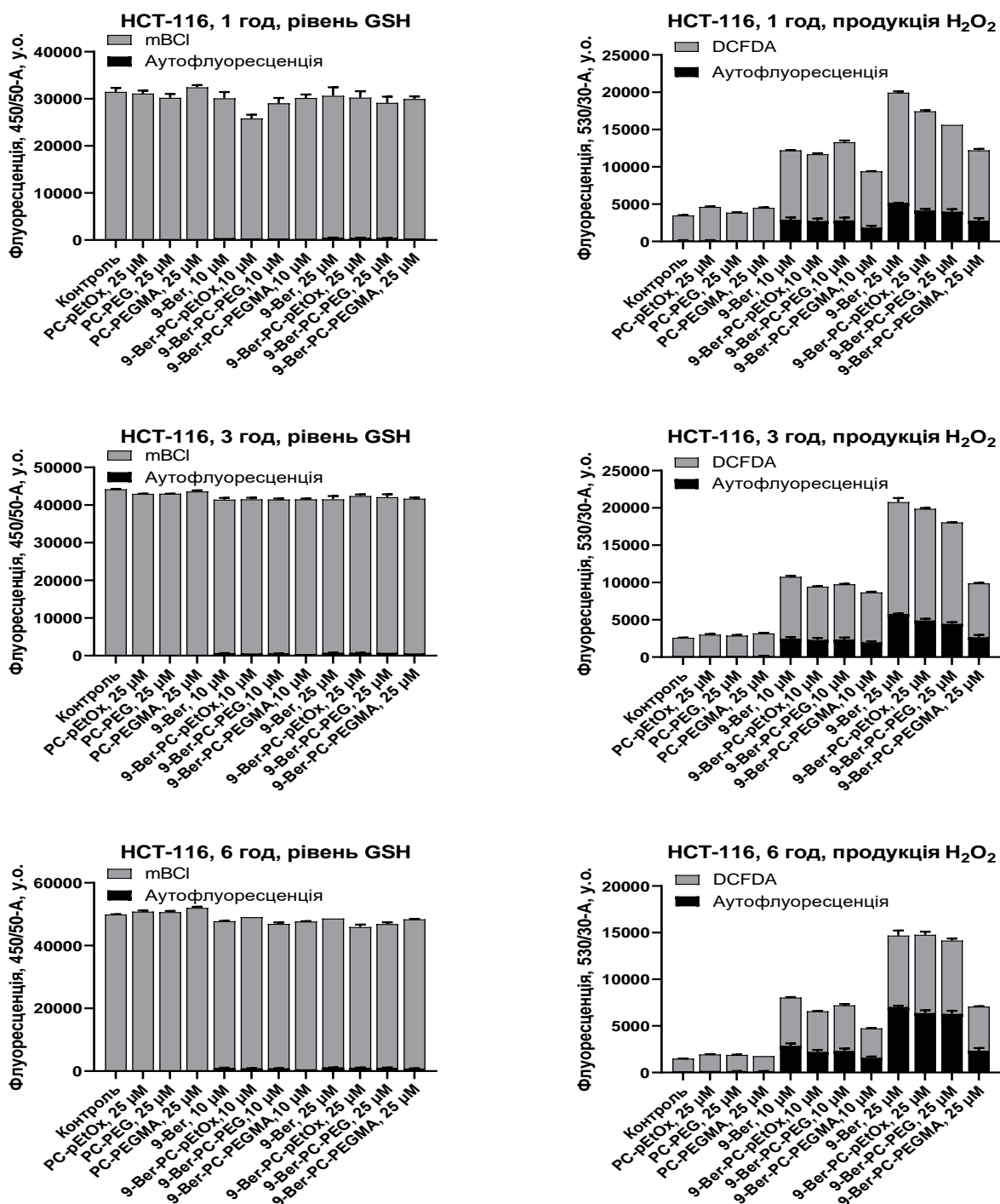


Рис. 50. Порівняння впливу 9-О-октил-берберину у вільній формі, та іммобілізованого на полімерних носіях з фрагментом полі-2-оксазоліну (PC-rEtOx), ПЕГ 5000 (PC-PEG) та гліцидилметакрилату (PC-PEGMA), на продукцію гідроген пероксиду та рівень відновленого глутатіону у клітини карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116. Фарбування 2,7-дигідрофлуоресцеїндіацетатом (DCFDA) та монохлоробіманом (mBCl), проточна цитофлуориметрія, 1, 3, 6 год інкубації.

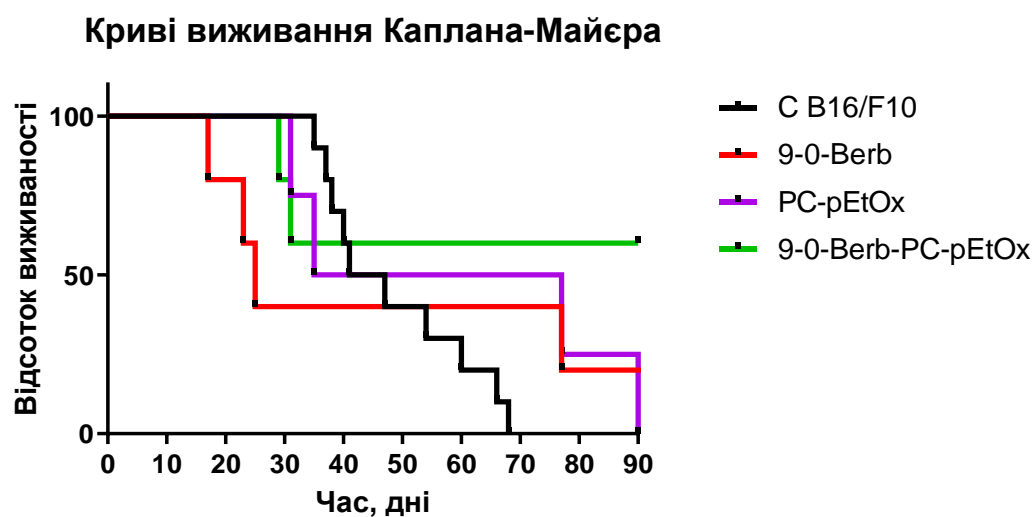
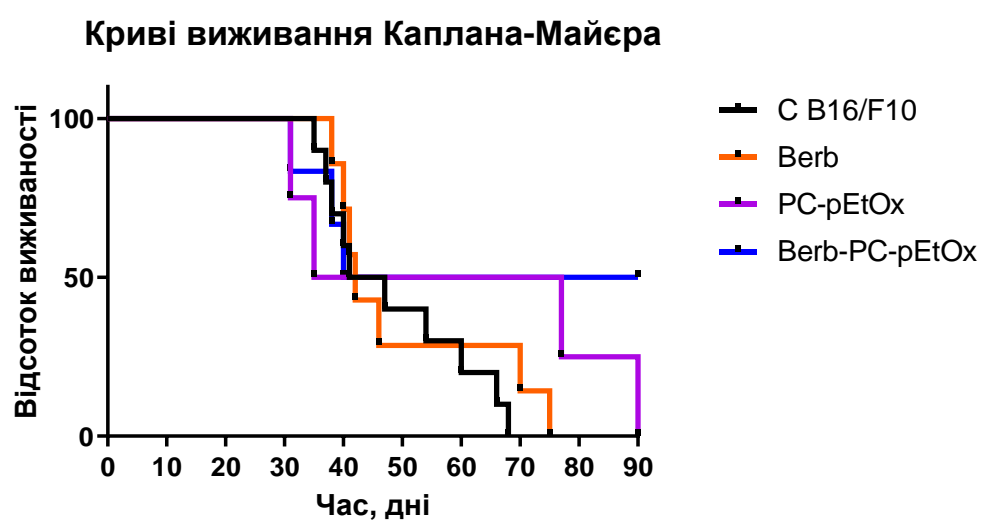
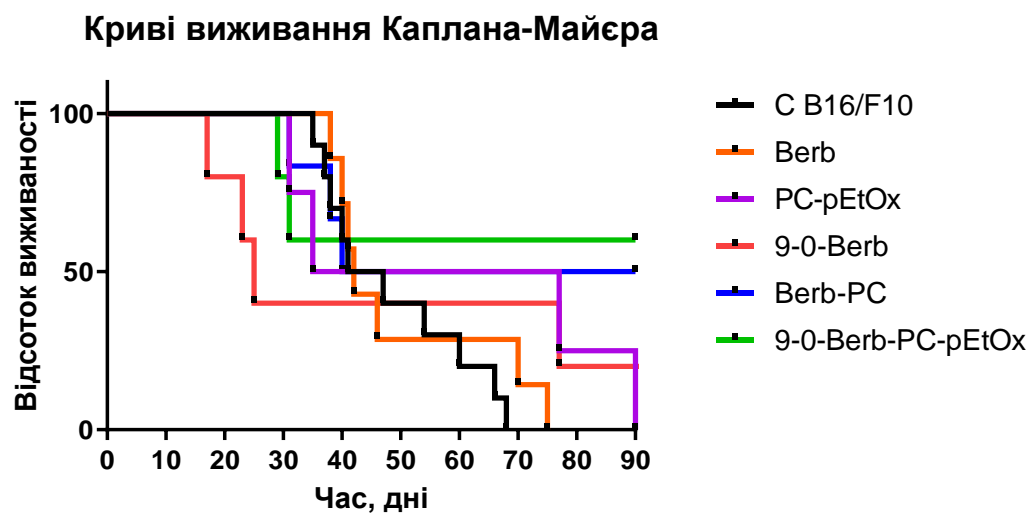


Рис. 51. Виживанність тварин-пухлиноносіїв з меланомою B16/F10 wt за лікування берберином, 9-О-октил-берберином та їхніми комплексами на полімерному носії з прищепленим фрагментом поліоксазоліну.

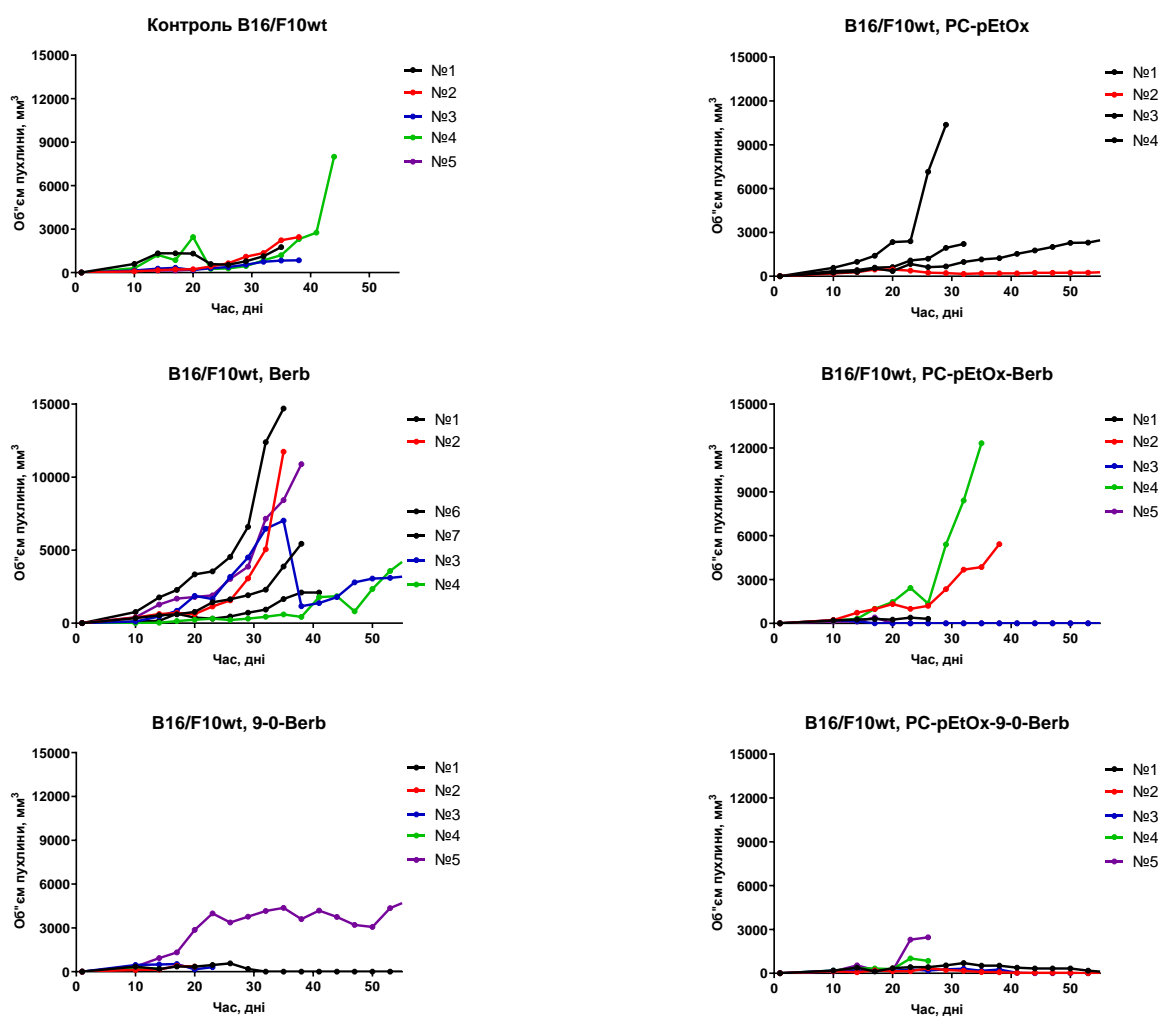


Рис. 52. Розмір пухлин у тварин-пухлиноносіїв з меланою B16/F10 wt за лікування берберином, 9-О-октил-берберином та їхніми комплексами на полімерному носії з прищепленим фрагментом полі-2-оксазоліну (індивідуальні значення для кожної тварини)

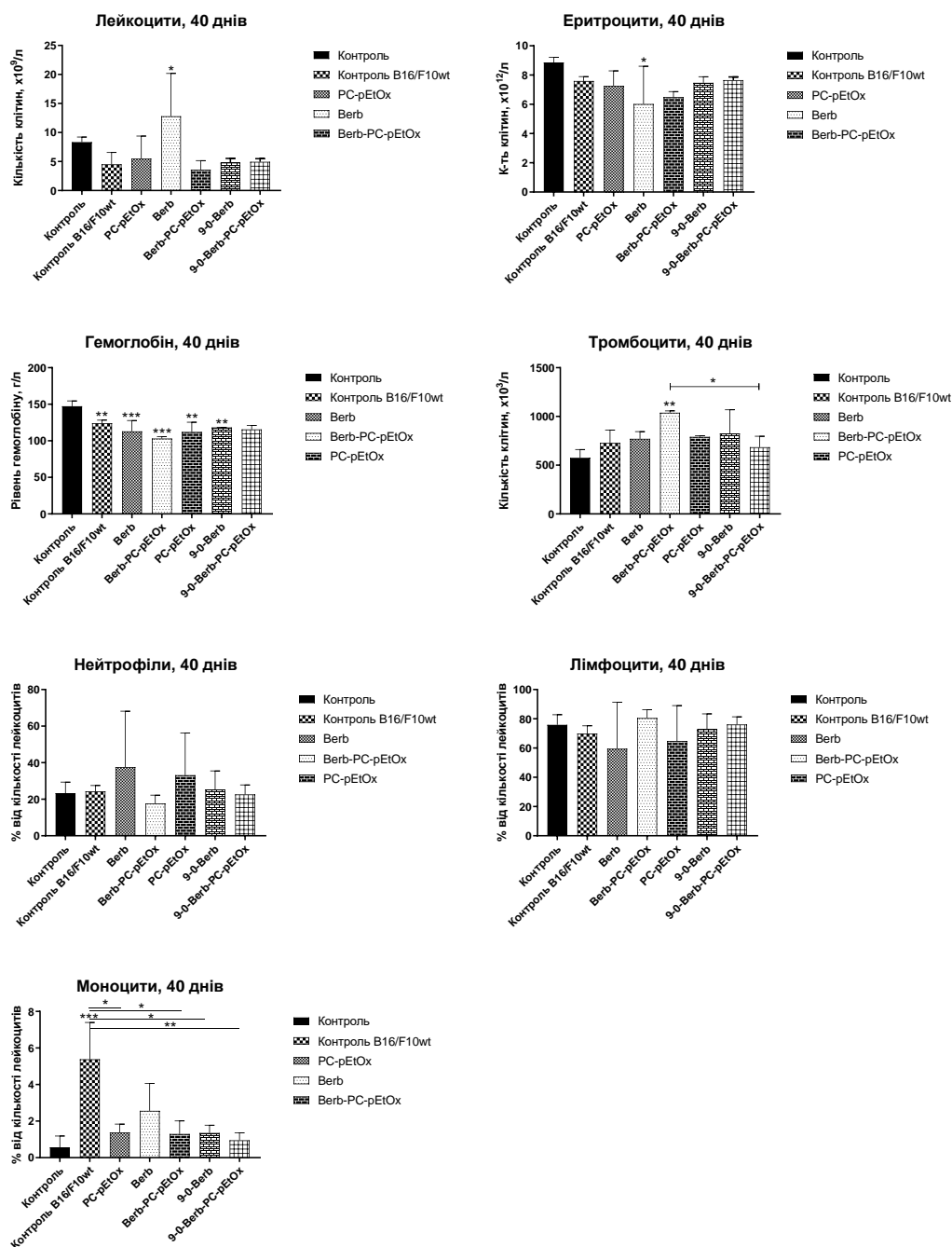


Рис. 53. Зміни показників крові у мишей лінії C57BL/6 за лікування берберином і 9-О-октил-берберином та його іммобілізованими на полімерному носії комплексами на 40-й день експерименту. Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$).

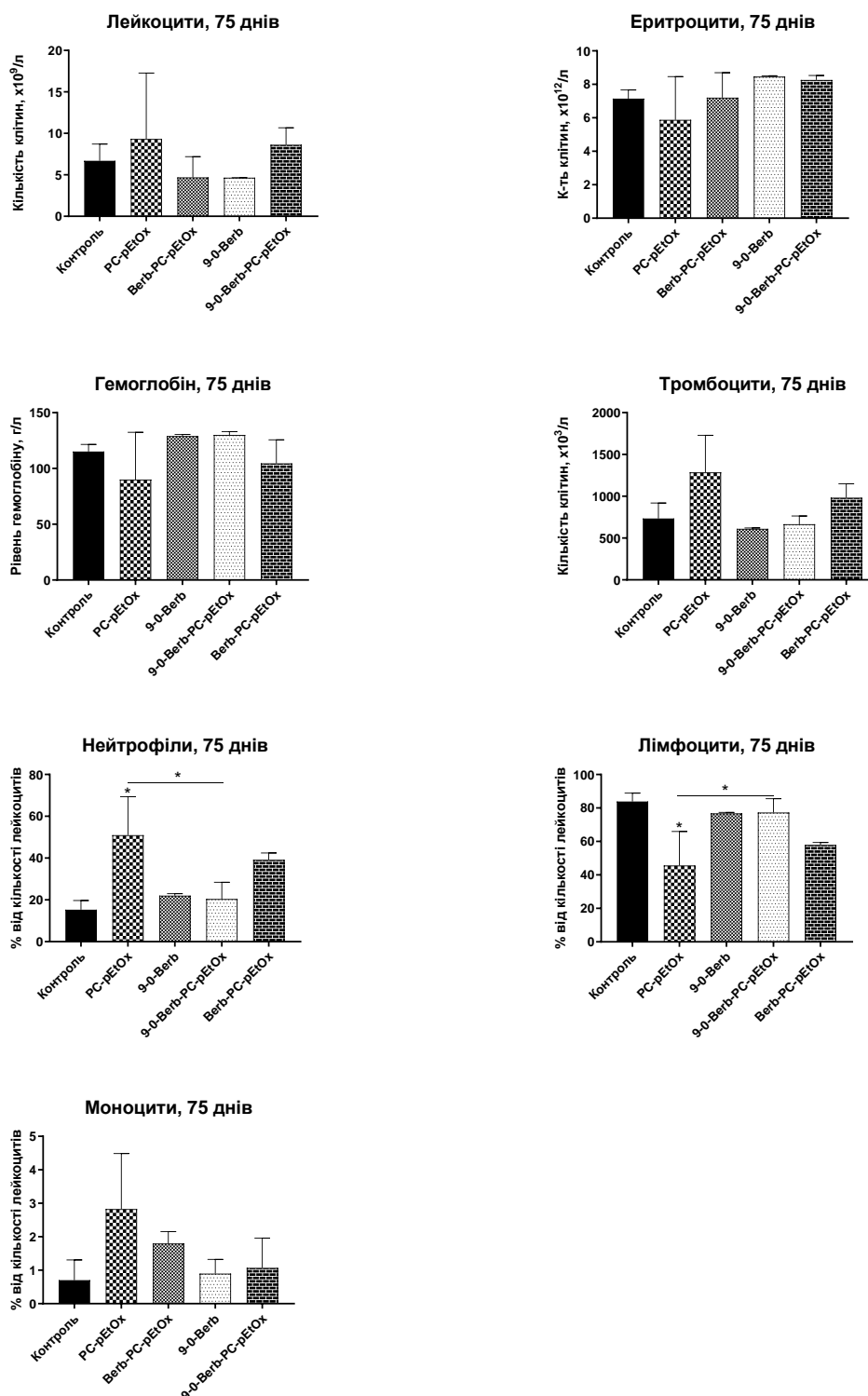


Рис. 54. Зміни показників крові у мишей лінії C57BL6 за лікування берберином і 9-О-октил-берберином та його іммобілізованими на полімерному носії комплексами на 75-й день експерименту. Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$)

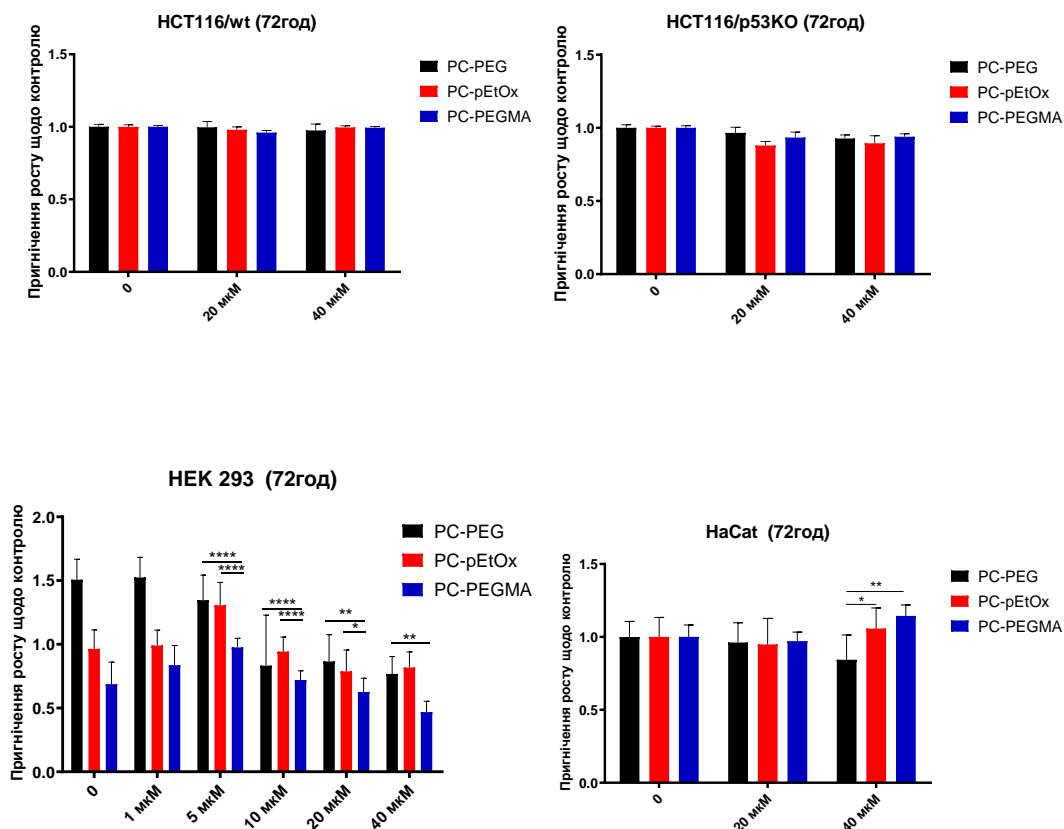


Рис. 55. Результати вивчення цитотоксичної активності полімерних носіїв *in vitro* щодо різних пухлинних та псевдонормальних ліній. МТТ-тест, інкубація 72 год (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

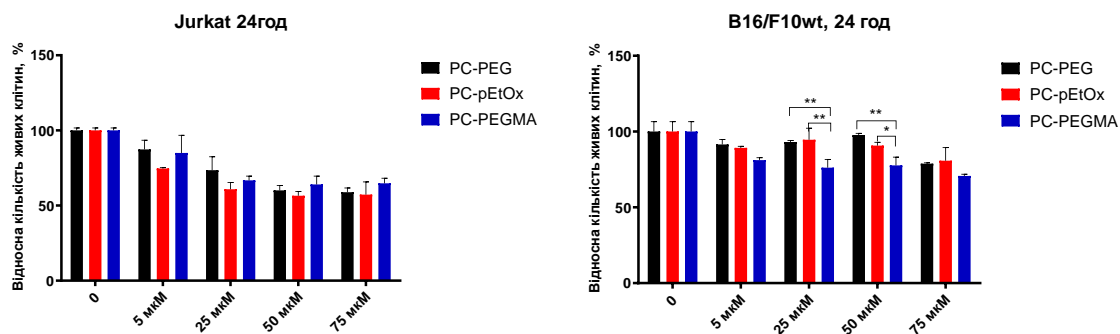


Рис. 56. Результати вивчення цитотоксичної активності полімерних носіїв *in vitro* щодо пухлинних ліній Т-лімфоцитів лінії Jurkat та мишачої меланоми B16/F10. Тест на виключення трипанового синього, інкубація 24 год (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

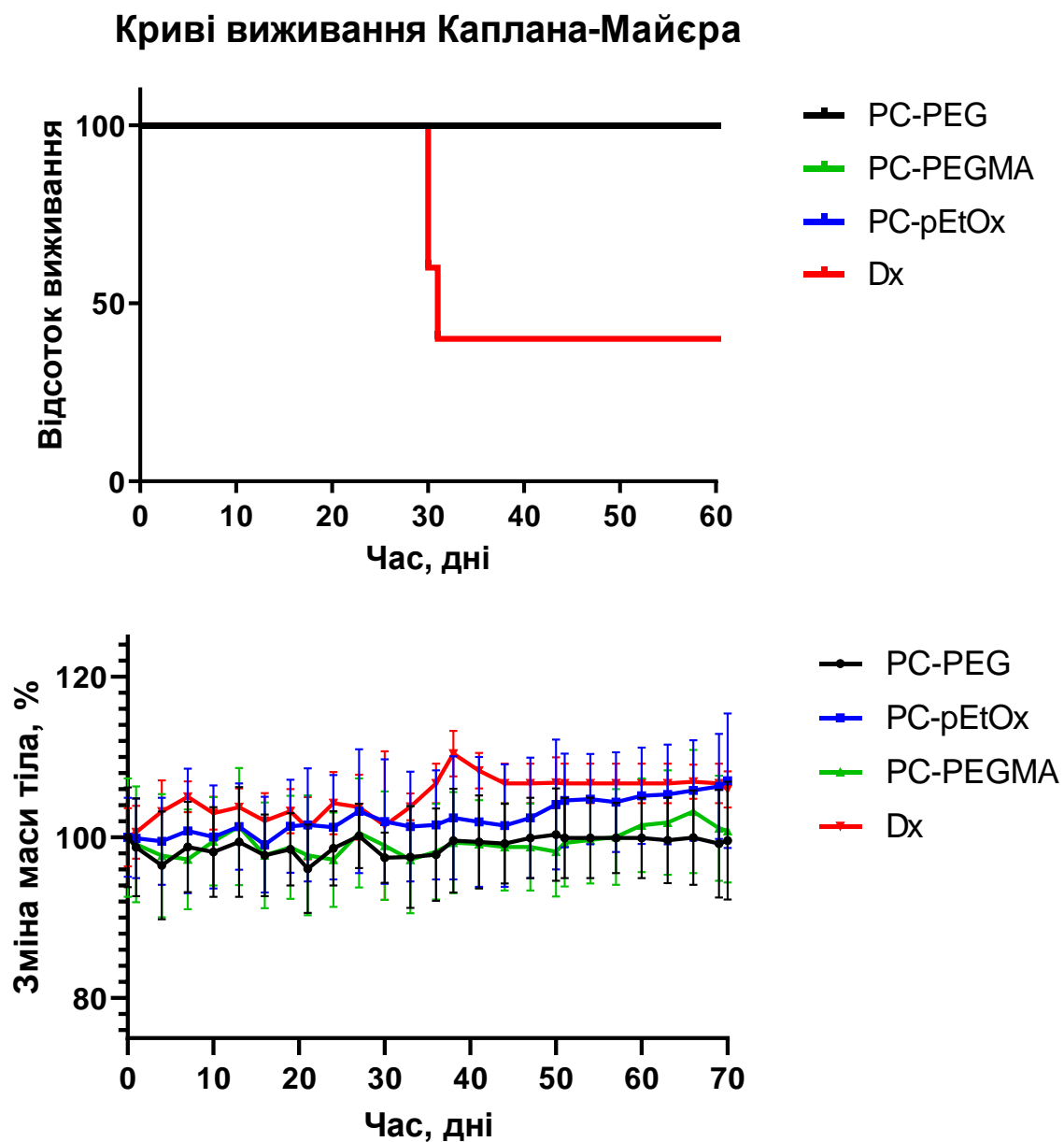


Рис. 57. Порівняння впливу полімерів на основі VEP-co-GMA та PEGMA-co-DMM на виживаність мишей лінії C57BL/6 (А) та їх масу тіла (В) після введення дози 664 мг/кг полімерних наночастинок у порівнянні з доксорубіцином у дозі 20 мг/кг.

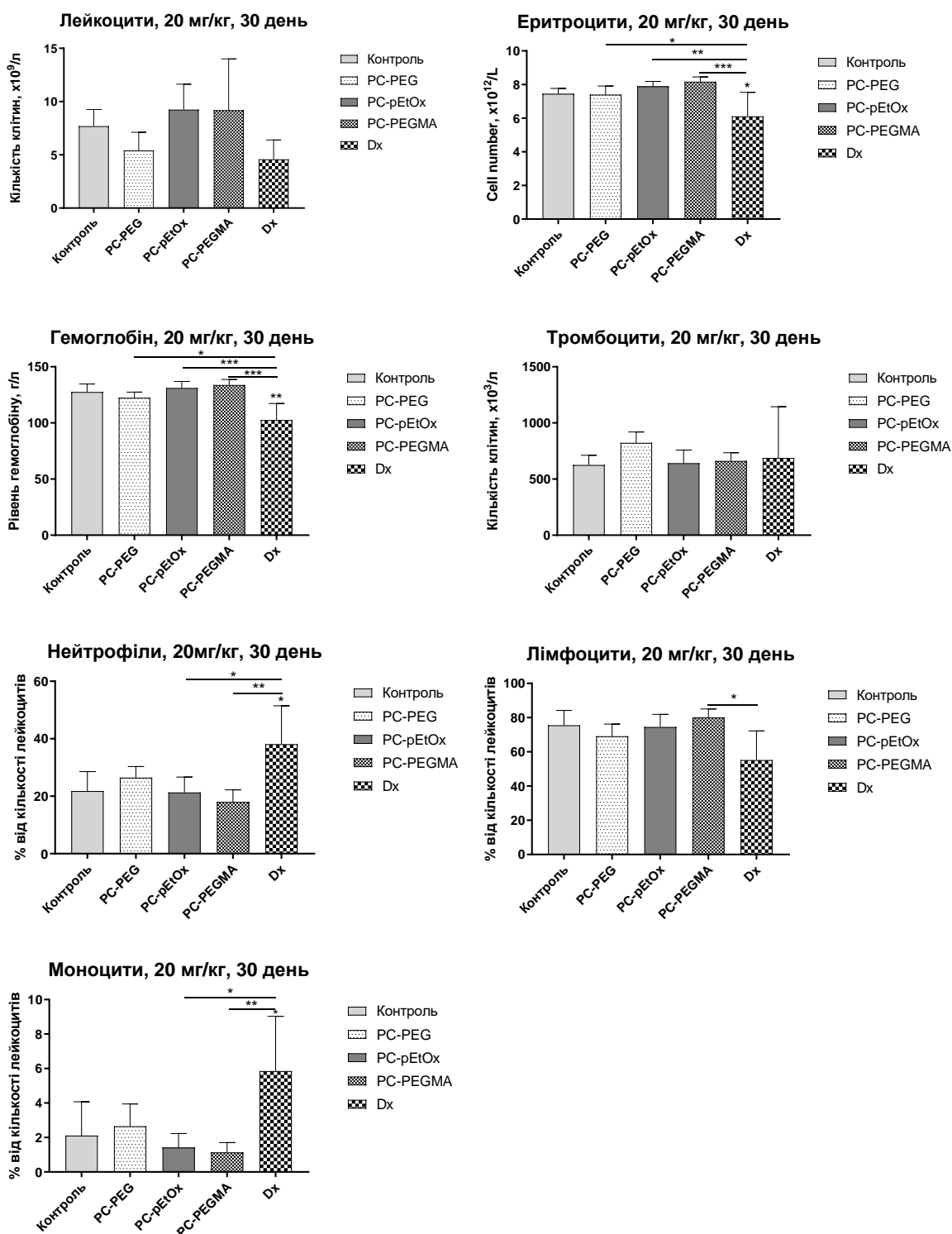


Рис. 58. Зміни гематограми у мишей лінії C57BL6 при введенні сублетальної дози Dx (20 мг/кг), зразків полімеру PC (664 мг/кг) (n=5) на 30-й день експерименту. Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

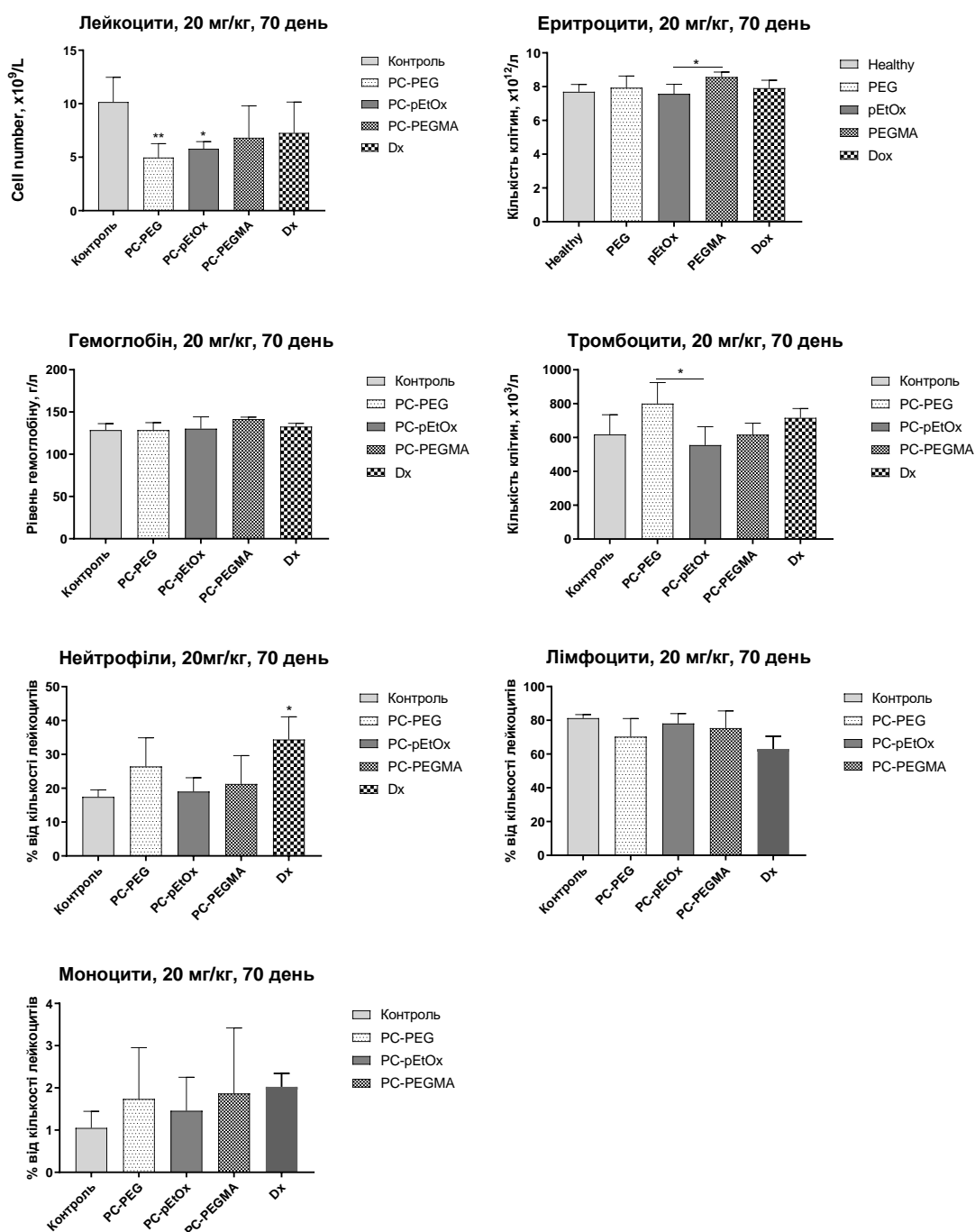


Рис. 59. Зміни гематограми у мишей лінії C57BL6 при введенні сублетальної дози Dx (20 мг/кг), зразків полімеру PC (664 мг/кг) (n=5) на 70-й день експерименту. Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

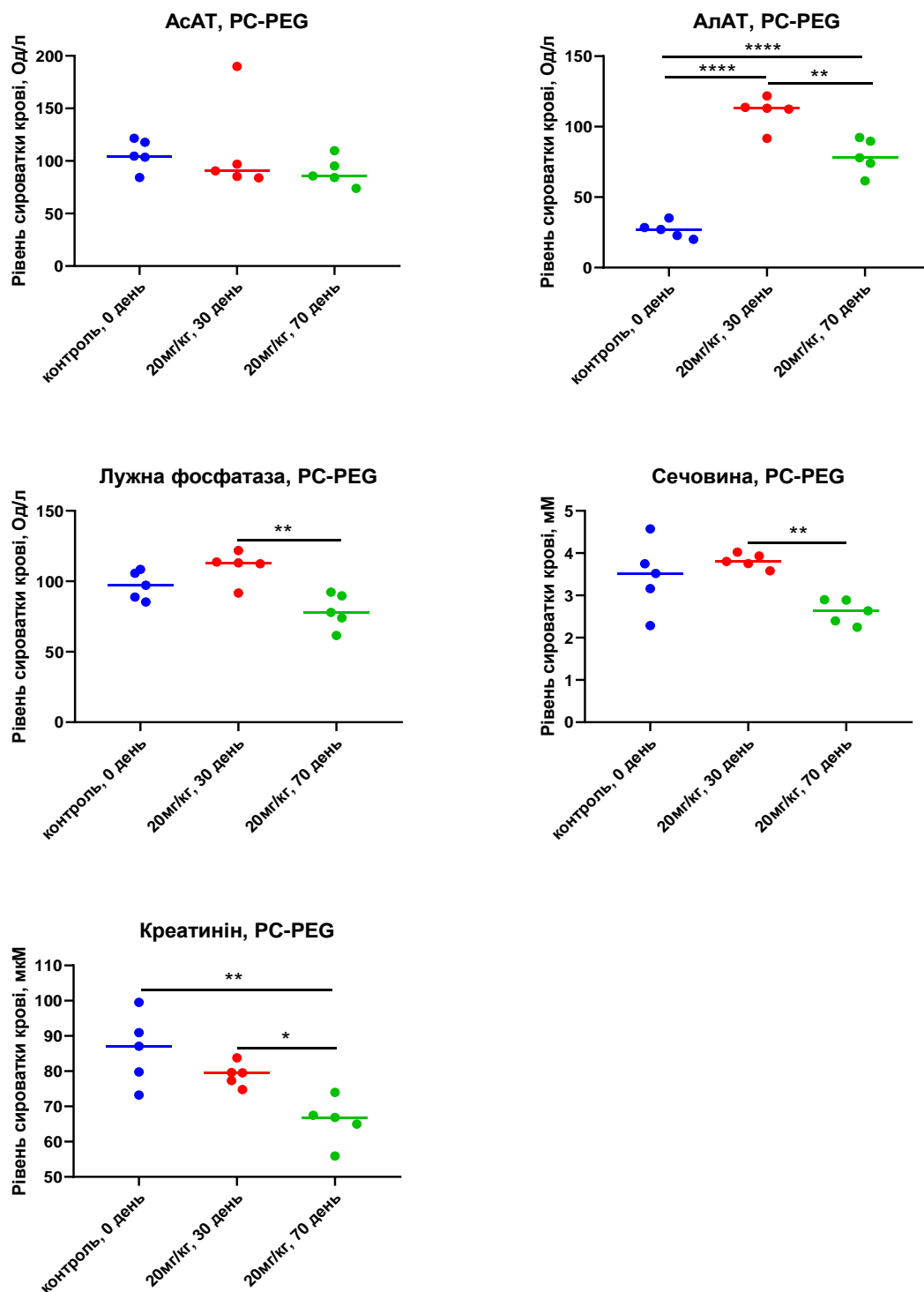


Рис. 60. Часозалежні зміни маркерів гепато- та нефротоксичності у мишей лінії C57BL6 за умов введення носія PC-PEG (664 мг/кг)(n = 5). Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

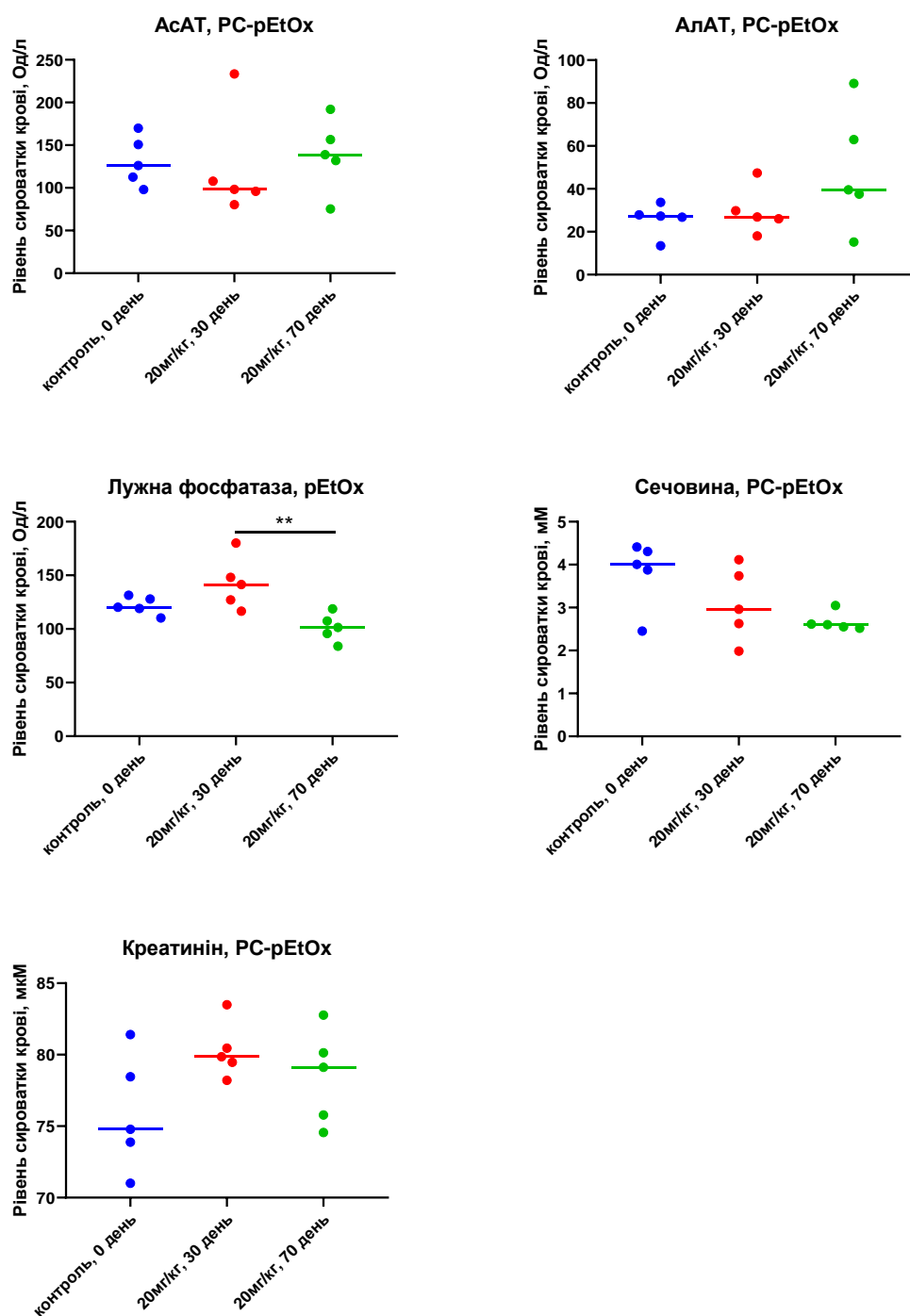


Рис. 61. Часозалежні зміни маркерів гепато- та нефротоксичності у мишей лінії C57BL/6 за умов введення носія PC-pEtOx (664 мг/кг)(n = 5). Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

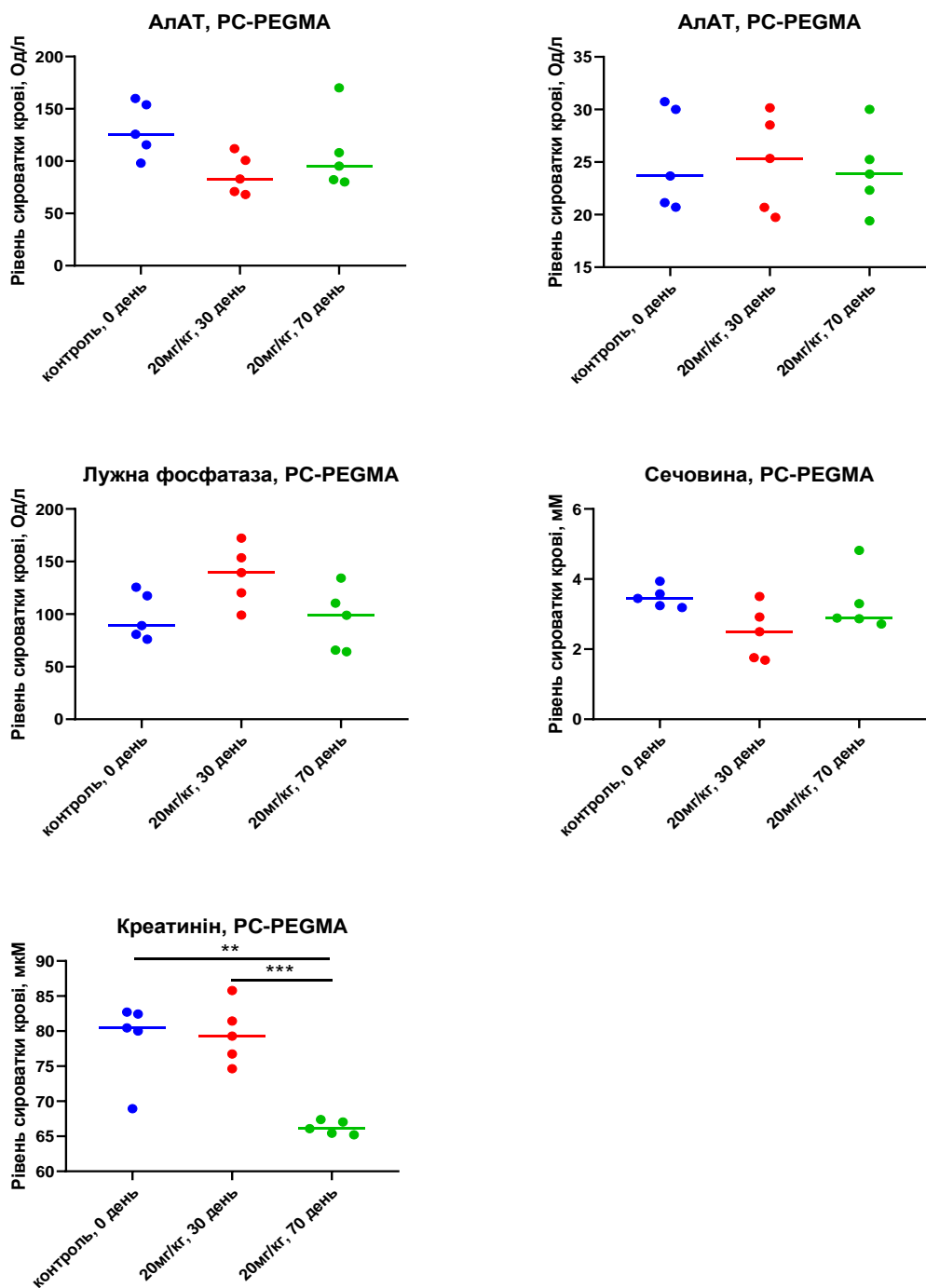


Рис. 62. Часозалежні зміни маркерів гепато- та нефротоксичності у мишей лінії C57BL/6 за умов введення носія PC- PEGMA (664 мг/кг) (n = 5). Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$).

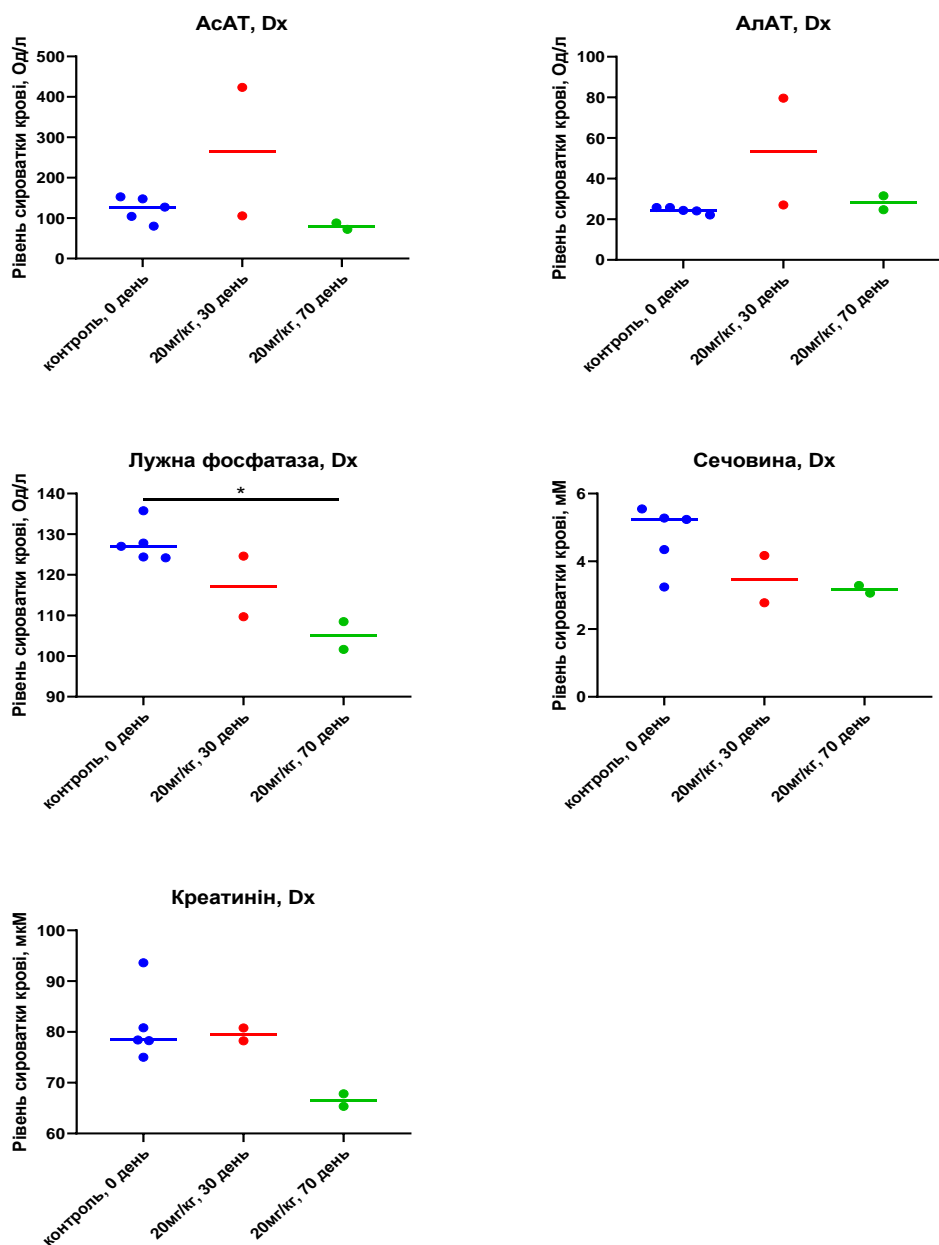


Рис. 63. Часозалежні зміни маркерів гепато- та нефротоксичності у мишей лінії C57BL6 за умов введення сублетальної дози доксорубіцину Dx (20 мг/кг) (n = 5). Значущість по відношенню до контролю та інших груп розраховували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA та тесту множинного порівняння Т'юкі (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$).

Таблиця 10. Зміни розподілу клітинного циклу в клітинах Т-лімфоцитів лінії Jurkat за дії mag.SLPs, SLPs, IO-OA та IO

Зразки	Кількість клітин кожної фази клітинного циклу, mean±SD			
	Pre-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
Контроль	5.58±0.26	52.44±0.84	29.4±2.67	12.58±1.57
Dx 0,5 мкМ	17.41±0.22**	26.18±0.29	38.95±2.74 **	17.47±2.23
1, 1 мкг/мл	7.61±0.04	51.47±4.39	28.64±0.76	12.27±3.67
1, 2.5 мкг/мл	23.47±0.15***	53.57±0.51	9.92±0.25	13.04±0.61
1, 5 мкг/мл	76.69±2.3***	13.81±1.72	6.63±0.81	2.87±0.22
2, 1 мкг/мл	6.39±0.22	54.65±2.44	29.14±0.53	9.82±1.91
2, 2.5 мкг/мл	21.01±0.12***	56.89±0.03	9.33±0.50	12.78±0.65
2, 5 мкг/мл	69.35±0.38***	19.01±0.64	7.87±0.15	3.76±0.41
3, 1 мкг/мл	7.69±0.08	56.3±2.63	26.6±0.77	9.41±1.95
3, 5 мкг/мл	8.23±1.13	55.83±0.83	27.39±0.45	8.55±1.51
4, 1 мкг/мл	8.75±0.06	45.52±1.81	30.28±0.05	15.44±1.81
4, 5 мкг/мл	17.99±0.55**	39.51±0.68	27.78±0.09	14.73±1.13

1 - mag.SLPs, 2 – SLPs. 3 - IO-OA. 4 – IO, Dx – доксорубіцин (позитивний контроль)

Примітка: ** – $p < 0.01$ відносно необробленого контролю, *** – $p < 0,001$ відносно необробленого контролю. Дані були проаналізовані за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим постфактум тестом множинного порівняння Т'юкі.

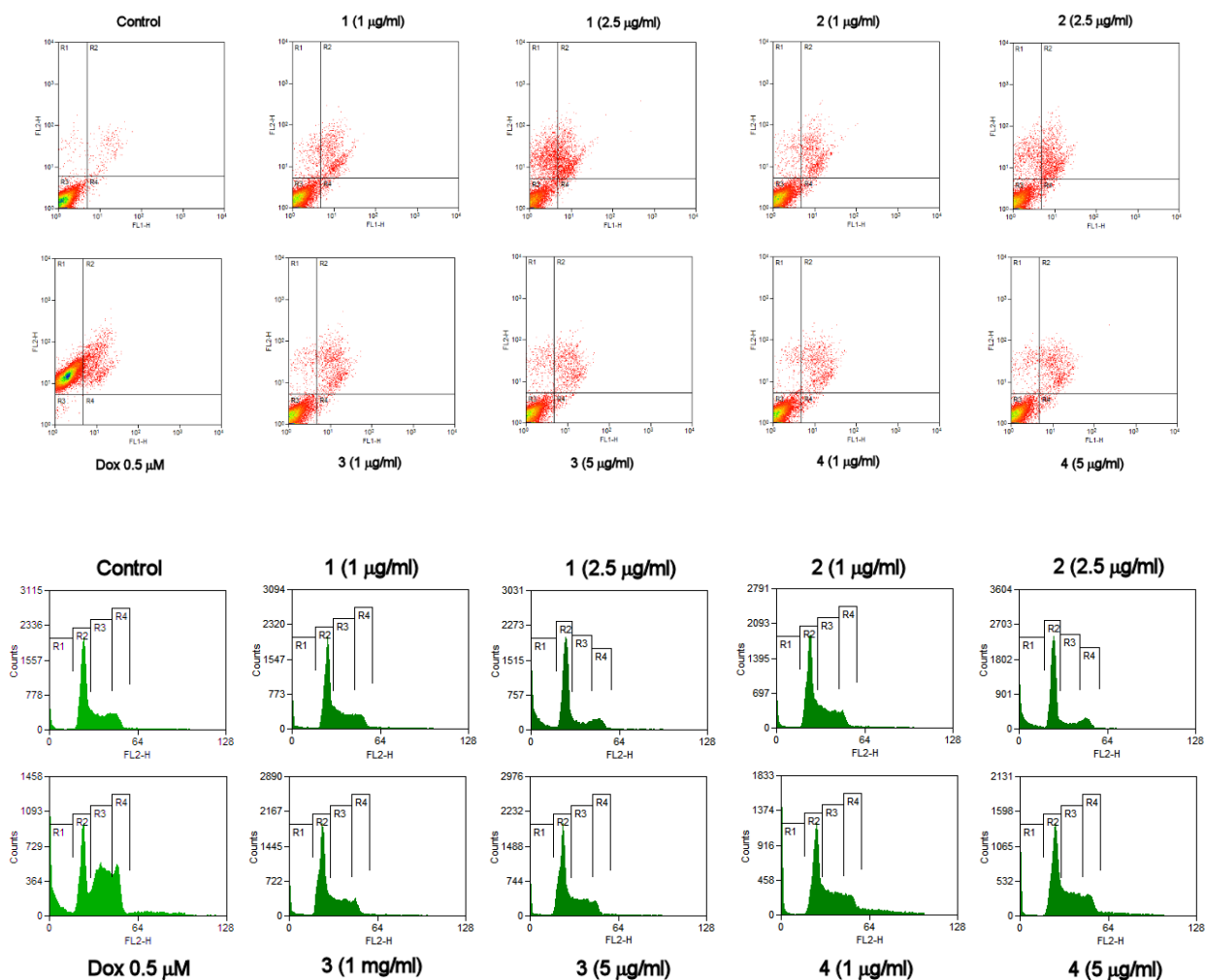


Рис. 64. Гістограми зупинки клітинного циклу та індукції клітинної загибелі mag.SLPs (A) Вплив зазначених доз сполук на розподіл клітин Т-лімфоцитів лінії Jurkat у різних фазах клітинного циклу визначали за допомогою FACS аналізу, забарвлених йодидом пропідію, після 24 годин безперервної експозиції. (B) Оцінка впливу mag.SLPs (24-годинна інкубація) на екстерналізацію фосфатидилсерину в Т-клітинах лінії Jurkat визначалася за допомогою FACS аналізу з використанням FITC-міченого аннексину V і PI фарбування. Показано один з трьох експериментів, в яких отримано порівняльні дані.

1 – mag. SLPs, 2 – SLPs. 3 - IO-OA. 4 – IO, Dx - доксорубіцин (позитивний контроль). ***- $p \leq 0,001$, порівняння відносно необроблених (контроль) клітин.