

PACS numbers: 81.07.Pr, 82.45.Tv, 83.80.Lz, 87.15.-v, 87.19.xj, 87.64.-t, 87.85.Rs

## **Гетерокоагуляция модифицированных полисахаридами и функционализированных фолатами наночастиц платины с раковыми клетками**

В. Р. Эстрела-Льопис, А. В. Чевычалова, Е. М. Фесенко\*,  
Г. И. Довбешко\*, П. М. Литвин\*\*

*Институт биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины,  
бульв. Акад. Вернадского, 42,  
03680, ГСП, Киев-142, Украина*

*\*Институт физики НАН Украины,  
просп. Науки, 46,  
03028 Киев, Украина*

*\*\*Институт физики полупроводников им. В. Е. Лашкарёва НАН Украины,  
просп. Науки, 41,  
03028 Киев, Украина*

Разработан метод синтеза таргетных, функционализированных фолатами и модифицированных полисахаридами наночастиц платины  $Pt^{PC}-ФК$  и исследовано их влияние на опухолевые клетки различного онкогенеза. Оптимальные условия синтеза  $Pt^{PC}-ФК$  установлены на основе электро-поверхностных и спектральных исследований формирования адсорбционного слоя полисахаридов и фолатов на поверхности наночастиц. Установлена оптимальная концентрация реагентов, условия (время, температура, порядок смешивания) для синтеза нанокомпозитов  $Pt^{PC}-ФК$ . На основе исследований гетерокоагуляции  $Pt^{PC}-ФК$  с раковыми клетками и кинетики цитотоксического эффекта определено токсическое действие таких частиц на раковые клетки и селективность в сравнении со здоровыми клетками. При исследовании использованы методы атомно-силовой, электронной и оптической микроскопии и ИК-спектроскопия.

Розроблено метод синтезу таргетних, функціоналізованих фолатами та модифікованих полісахаридами наночастинок платини  $Pt^{PC}-ФК$ , досліджено їх вплив на пухлинні клітини різного онкогенезу. Оптимальні умови синтезу  $Pt^{PC}-ФК$  встановлено на основі електроповерхневих і спектральних досліджень формування адсорбційного шару полісахаридів та фолатів на поверхні наночастинок. Встановлено оптимальну концентрацію реагентів, умови (час, температура, порядок змішування) для синтезу нанокомпозитів  $Pt^{PC}-ФК$ . На основі досліджень гетерокоагуляції  $Pt^{PC}-ФК$  з клітинами раку крові та кінетики цитотоксичного ефекту визначено ток-

сичну дію таких частинок на ракові клітини та її селективність у порівнянні з впливом на здорові клітини. При дослідженні використано методи атомно-силової, електронної й оптичної мікроскопії та ІЧ-спектроскопії.

The method for synthesis of targeted platinum nanoparticles (Pt<sup>PS</sup>-F) functionalized by folate and modified by polysaccharides is developed, and the effect of these polysaccharides on tumour cells of different carcinogenesis is studied. Optimal conditions for the Pt<sup>PS</sup>-F synthesis are revealed, based on spectral and electro-surface studies of formation of the adsorption layer of polysaccharides and folate on the surface of nanoparticles. The optimum concentration of reactants and the conditions (time, temperature, sequence of mixing) for the synthesis of the Pt<sup>PS</sup>-F nanocomposites are established. The toxic effect of nanocomposites on the cancer cells and its selectivity in comparison with healthy cells are determined by means of investigation of heterocoagulation and kinetics of cytotoxic effect. The methods of atomic force, electron and optical microscopies as well as IR-spectroscopy are used.

**Ключевые слова:** наночастицы платины, полисахариды, фолаты, клетки рака крови, клетки рака яичника линии A2780, карцинома Эрлиха, гетерокоагуляция, цитотоксический эффект.

*(Получено 10 декабря 2013 г.)*

## 1. ВВЕДЕНИЕ

В последние 20 лет интенсивно развиваются исследования в области применения наночастиц (НЧ) золота и серебра в биологии и медицине, в частности, в области биодетекции [1] и для интенсификации действия физиотерапевтических методов лечения (фотодинамический, фототермический и радиотерапия [2–7]), а также для направленного транспорта лекарственных препаратов [8, 9]. Такие применения связаны с плазмон-несущими свойствами НЧ золота и серебра (биодетекция) [10] и с их нетоксичностью [8, 11].

В обзоре [12] отмечено, что исследования по применению наночастиц платины практически отсутствуют. Этот факт вызывает удивление, поскольку в химиотерапии широко применяются комплексы ионов платины с различными органическими соединениями, например, цисплатин. Возможно, повышенное побочное токсическое действие таких препаратов вызвало задержку в соответствующих исследованиях по применению наноплатины. Однако в монографии [13] К. Б. Яцимирский отмечал, что, в отличие от ионных, нейтральная форма платины Pt(0) не является токсичной.

Работами последних лет показана возможность применения наноплатины для инактивации раковых клеток. Так, в работе [14] показано, что, благодаря своим каталитическим свойствам, наночастицы платины проявляют активность подобно митохондриальному коэнзиму никотинамид-аденин-динуклеотиду, который окис-

ляется в присутствии НЧ платины, что влияет на синтез АТФ и, соответственно, на жизнедеятельность клетки. Здесь же показано, что в кислой среде фагосом (где концентрируются попавшие в клетку в результате фагоцитоза частицы платины) происходит выделение свободных ионов платины с поверхности таких частиц, и эти ионы также являются цитотоксичными. В работе [15] показано, что под действием таких ионов в клетках глиобластомы U251 и фибробластах лёгких человека IMR-90 происходит нарушение деления (пролиферация) и усиление апоптоза<sup>1</sup>. Эффект объясняется повреждением ДНК таких клеток в результате выделения активных форм кислорода ( $H_2O_2$  и  $O^{2-}$ ) под влиянием ионов платины. Отметим, что наночастицы платины в работе [15] были стабилизированы поливиниловым спиртом.

В нашей работе для стабилизации наночастиц платины применялись полисахариды микроводоросли *Chlorella vulgaris*, штамм ЛАРГ-3 (Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск). Этот выбор связан с известными результатами независимых исследований, где были доказаны противораковые свойства самих полисахаридов. Так, в работе [16] показано, что высокомолекулярные ПС хлореллы стимулируют синтез цитокинов и ИЛ-6, ИЛ-10, INF- $\gamma$ , фактора некроза раковых клеток TNF- $\alpha$  и пролиферацию спленоцитов. В работе [17] показано, что кислый полисахарид ChlonA микроводоросли *Chlorella pirenoidosa* стимулирует фагоцитарную активность ретикулоэндотелиальной системы крыс, повышает иммунитет. В работе [18] показано, что высокомолекулярный анионный полисахарид клеточного матрикса гиалуронан ингибирует процессы метастазирования и снижает мультирезистентность раковых клеток. Отметим, что в работе [19], посвящённой разработке метода получения монокристаллов-нанопризм золота, основанного на применении полисахаридов *Chlorella vulgaris* штамм ЛАРГ-3 как восстановителя-стабилизатора, было установлено, что эти ПС имеют средний молекулярный вес 500 кДа и анионную природу. Известно также влияние полисахаридов грибов на активацию иммунной системы организма [20]. Полисахариды гинкго билоба активируют апоптоз и торможение пролиферации клеток рака желудка [21].

**Полисахариды и фагоцитоз.** Полисахариды усиливают проникновение наночастиц в клетку на основе известного механизма фагоцитоза. Так, ещё в 1978 году было показано, что анионные высокомолекулярные полиэлектролиты лучше, чем катионные и нейтральные полимеры проникают и воздействуют на клетки сар-

---

<sup>1</sup> Апоптоз — программируемая клеточная смерть, регулируемый процесс самоликвидации на клеточном уровне, в результате которого клетка фрагментируется на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Один из методов терапии рака — активация апоптоза раковых клеток (способных, в отличие от здоровых, делиться практически бесконечно).

комы-180 [22]. В работе [23] показано, что полианионы вызывают переориентацию фосфолипидов в мембране, что облегчает её деформацию и стимулирует фагоцитоз наночастиц, покрытых адсорбционным слоем таких полианионов. Полисахариды могут разлагаться в кислой среде фагосом, что создаёт возможность прямого действия покрытых ими частиц препарата [23].

Интересно отметить, что в последнее время эффективно развивается близкое к рассматриваемому нами направление carbohydrate (polysaccharide) targeting [24]. Здесь полисахариды применяются как лиганды для создания сахарид-модифицированных лекарственных препаратов. Данное направление связано с особенностями процесса гликолиза при развитии злокачественных образований. Известно [25], что опухолевые клетки утилизируют глюкозу со значительно большей скоростью, даже в анаэробных условиях, чем клетки здоровых тканей — опухоль является своеобразной «ловушкой» для глюкозы. В монографии [26] указано, что гликолитический фенотип — это почти универсальный феномен опухолей человека. Поэтому, вполне возможно, что раковые клетки и опухоли агрегируют и усваивают глико-таргетные наноносители по механизмам, которые определяют характерный для них повышенный уровень усвоения глюкозы.

**Функционализация наночастиц фолатами** применяется для их селективного связывания с трансформированными клетками. Известно, что более 40% клеток различного онкогенеза и, прежде всего, интенсивные формы раковых патологий, выделяют на своей поверхности повышенную концентрацию фолат-рецепторов (белок — гликозилфосфатидинозитол-линкер  $FR^+$ ). Фолаты — натриевые или кальциевые соли фолиевой кислоты (витамин  $B_9$ ) также способствует транспорту макромолекул внутрь клетки на основе рецептор-модулированного эндоцитоза [27]. Поэтому фолаты являются антиген-биомаркерами для клеток, имеющих фолат-рецептор  $FR^+$ . При этом нормальные клетки здоровых тканей таких фолат-рецепторов не имеют, что и позволяет лекарствам с фолатами связываться только с трансформированными клетками опухоли. Фолаты проникают в цитозоль, но не связываются с лизосомальными компонентами [28].

Функционализацию фолатами применяют для адресной доставки лекарственных препаратов (targeting drug delivery) золотых [29, 30] и магнитных [31] частиц. В последнее время появились работы по применению фолатов для функционализации наночастиц платины. В работе [32] представлены результаты синтеза платиновых наночастиц с адсорбционным слоем фолатов (НЧ Pt-ФА) и исследования их действия на раковые и нормальные клетки. По данным электрофореза такие частицы были заряжены отрицательно. Исследовалось воздействие Pt-ФА на здоровые клетки МС-3Т3-Е1 и

клетки костной опухоли ROS 17/2.8. Было показано, что при больших концентрациях НЧ Pt-ФА (130–260 мг/л) имеет место 100% гибель клеток в двух культурах. Напротив, при низких концентрациях выживало 98,5% нормальных клеток MC-3T3-E1 и 32,85% раковых клеток ROS 17/2.8. Избыток раствора фолата в смеси клеток с НЧ Pt-ФА нивелировал такую селективность, что связывается с блокировкой фолат-рецепторов раковых клеток ионами фолата из раствора и исключением в дальнейшем возможности их агрегирования с НЧ Pt-ФА.

Аналогичные результаты получены в работе [33], где исследовано взаимодействие функционализированных фолатами и покрытых анионными и катионными электролитами наночастиц золота с клетками рака груди линии VP 229 и MDA MB 231 (в сравнении с частицами без фолата или клетками с  $FR^+$  — неактивированными макрофагами). Для нас представляет интерес сделанный на основе спектральных исследований вывод авторов о том, что связь фолатов с анионным полиэлектролитом осуществляется по электростатическому механизму, а не на основе ковалентной связи. При этом в работе отмечено, что в случае ковалентной связи фолатов с адсорбционным слоем полимера на поверхности НЧ возможно образование токсических побочных продуктов и снижение уровня селективности по фолат-связи.

Судя по известной литературе, на данный момент пока не удалось найти прямых аналогов нашей работы, цель которой — синтез и исследование для применения в онкотерапии наноконструктов на основе наноплатины, модифицированной полисахаридами микроводоросли хлорелла и функционализированной фолатами. Это обстоятельство, а также приведённые в обзоре сведения о механизмах цитотоксического действия на раковые клетки наноплатины и полисахаридов и о стимулирующем действии последних в процессе фагоцитоза покрытых ими наночастиц, а также данные о таргетной роли фолатов для повышения селективности агрегации наночастиц с раковыми клетками указывают на обоснованность поставленной в работе цели исследования.

## 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Клетки рака крови линии *Namalwa* и линии *Jurkat* выращивались на среде RPMI 1640 (SIGMA) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. В экспериментах использовалась суспензия таких клеток в питательной среде. Клетки линии *Namalwa* практически не имеют фолат-рецепторов  $FR^+$ , а для клеток линии *Jurkat* характерно повышенное выделение (*overexcretion*) таких рецепторов. Поэтому выбор лейкозных клеток указанных линий связан с необходимостью экспериментального подтверждения селективного вза-

имодействия НЧ Pt–ПС–ФА именно с клетками, выделяющими фолат-рецепторы.

**Отделение лимфоцитов из венозной крови здорового человека** выполнялось по стандартной методике центрифугирования крови в заданном градиенте плотности [34]. Такие клетки обычно рассматривают как здоровый аналог (контроль) раковых клеток крови. Здоровые клетки практически не имеют фолат-рецепторов [35]. Поэтому выбор здоровых лимфоцитов, как контроля, связан с необходимостью экспериментального подтверждения их пониженной, в сравнении с  $FR^+$ -клетками *Jurkat*, агрегации с НЧ Pt–ПС–ФА. Кроме того, сравнение агрегации здоровых лимфоцитов с НЧ PtПС с аналогичным эффектом для раковых клеток и *Namalwa* и *Jurkat* позволит установить селективность такой агрегации по отношению к раковым клеткам.

Клетки линии *Namalwa* и *Jurkat* и здоровые лимфоциты получали на экспериментальной базе Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины<sup>2</sup>.

**Клетки рака яичника человека линии A2780** выращивались на среде ISCOV (SIGMA-ALDRICH) + 10% FCS при температуре 37°C.

**Полисахариды (ПС) *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3** осаждали ацетоном из культуральной среды клеток хлорелла (при соотношении 2:1), предварительно упаренной при 70°C до 10-кратного уменьшения объема. Полисахариды отделяли центрифугированием, остатки ацетона удаляли выпариванием. Полученный продукт растворяли в дистилляте и диализовали против бидистиллята. Концентрацию полисахаридов определяли фенол-сернокислым методом [36].

**Наночастицы платины, стабилизированные адсорбционным слоем полисахаридов (НЧ PtПС)** получали восстановлением  $HPtCl_6 \cdot 3H_2O$  аскорбиновой кислотой с добавлением после 15–20 мин перемешивания указанной смеси раствора полисахаридов до их конечной концентрации в смеси 30 мг/дм<sup>3</sup>. Данная концентрация ПС установлена на основе комплекса экспериментов, включающего исследования изотермы адсорбции полисахаридов на наночастицах платины и изменения электрокинетического потенциала частиц в результате такой адсорбции (рис. 1). Здесь пунктиром выделен оптимальный интервал концентрации полисахаридов для стабилизации наночастиц платины и получения биоконъюгатов НЧ PtПС — 15–50 мгПС/дм<sup>3</sup>.

**Распределение наночастиц платины и биоконъюгатов НЧ PtПС по размерам** исследовали методом атомной силовой микроскопии (сканирующий зондовый микроскоп Dimension 3000, Bruker/Veeco) — рис. 2. Из сравнения рисунков 2, а, б видно, что

<sup>2</sup> Благодарим за подготовку культур лейкозных и нормальных клеток с.н.с., к.б.н. Е. Д. Шишко (ИЭПОР НАН Украины).

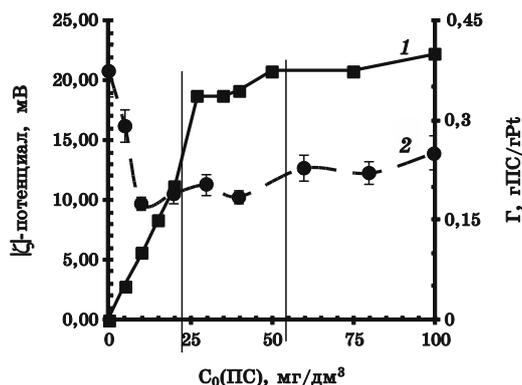


Рис. 1. Влияние адсорбции полисахаридов (1) на электрокинетический потенциал (2) наночастиц платины.

адсорбция ПС приводит к увеличению среднего размера частиц платины от 18 до 38 нм.

**Фолат натрия** ( $M = 495,41$ ) получали растворением 50 г фолиевой кислоты в 1 л 1 М раствора NaOH с последующим диализом (в темноте, с перемешиванием). **Фолат кальция** ( $M = 511,50$ ) — использовали готовый препарат фирмы «SIGMA-ALDRICH».

**Исследования влияния концентрации фолата Ca (FCa) или Na (FNa) на электрокинетический потенциал биоконъюгатов НЧ PtПС** применили для определения оптимальной концентрации ФА для синтеза НЧ Pt–ПС–ФА.

Взаимодействие наночастиц платины с адсорбционным слоем полисахаридов и таких же частиц, функционализированных фолатами (НЧ Pt–ПС–ФА), с раковыми и нормальными клетками крови изучали на основе комплекса методов, включающего исследование гетерокоагуляции этих наночастиц с клетками и цитотоксического эффекта.

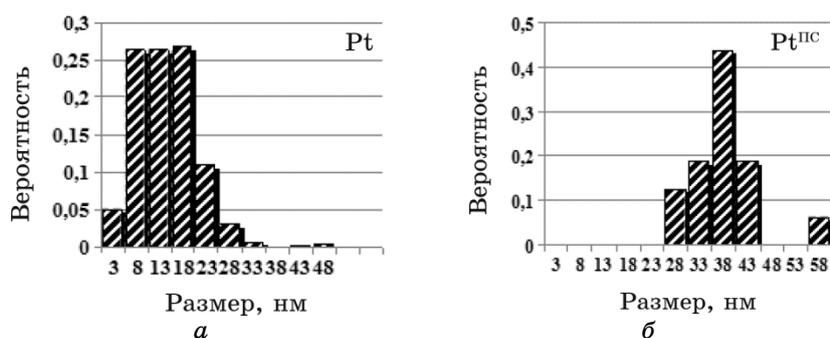


Рис. 2. Распределение частиц НЧ Pt (а) и НЧ Pt<sup>ПС</sup> (б) по размерам.

**Эффективность гетерокоагуляции** оценивали, определяя остаточную концентрацию по платине неагрегированных с клетками наночастиц в супернатанте после центрифугирования смеси клеток и частиц заданной концентрации, предварительно находящихся в контакте в течение одного часа [37].

**Цитотоксический эффект** воздействия наночастиц на раковые и нормальные клетки исследовали на основе определения стандартного индекса  $IC_{50}$  — концентрации действующего вещества, при которой за данный промежуток времени погибает 50% клеток заданной концентрации [38]. Мёртвые клетки выделяли красителем трипановым синим, их подсчёт выполняли методом оптической микроскопии соответствующего препарата клеток в камере Горяева.

**Методом ИК-спектроскопии** исследовали механизм взаимодействия наночастиц полисахаридов, адсорбированных на поверхности, с фолатами.

**Методом просвечивающей электронной микроскопии** JEM-1230 («JEOL», Япония) выполнено цитоморфологическое исследование ультраструктуры клеток [34].

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения функционализированных фолатами НЧ PtПС необходимо установить оптимальную концентрацию фолата, обеспечивающую его максимальную адсорбцию на наночастицах. Было предположено, что изменение поверхностного заряда (электрокинетического  $\zeta$ -потенциала) таких частиц в зависимости от концентрации фолата качественно соответствует изменению адсорбции фолатов на частицах. Результаты измерения зависимости  $\zeta$ -потенциала наночастиц PtПС и, для сравнения, наночастиц платины от концентрации FNa представлены на рис. 3. Как видно, в интервале концентрации фолата натрия до 20 мг/дм<sup>3</sup> происходит заметное увеличение по модулю  $\zeta$ -потенциала наночастиц, и с последующим ростом концентрации FNa их  $\zeta$ -потенциал практически не изменяется. Это позволяет допустить, что оптимальная концентрация для функционализации НЧ PtПС может быть выбрана в интервале 15–30 мг/дм<sup>3</sup>. Такая низкая концентрация по фолату исключает негативный эффект блокировки FR<sup>+</sup>-рецепторов раковых клеток при избыточной концентрации свободного фолата в растворе, на что обратили внимание авторы [32]. Как видно из данных, представленных на рис. 3,  $\zeta$ -потенциал частиц с фолатом натрия НЧ PtПС–FNa ниже, чем частиц НЧ Pt–FNa. Такое отличие связано с тем, что адсорбция полисахаридов на наночастицах платины в области концентрации ПС, применяемой для получения НЧ PtПС, уменьшает поверхностный заряд НЧ Pt (см. рис. 1). Во всех случаях

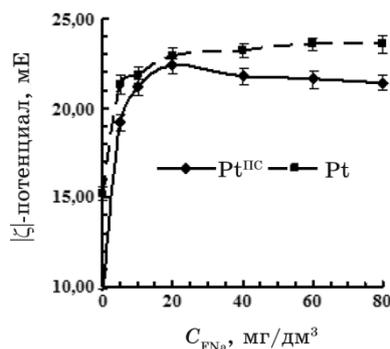


Рис. 3. Влияние концентрации фолата натрия на  $\zeta$ -потенциал наночастиц платины (Pt) и наночастиц платины с адсорбционным слоем полисахаридов (PtПС) в среде  $10^{-3}$  М NaCl.

частицы заряжены отрицательно, их  $\zeta$ -потенциал  $< 0$ .

Особенности взаимодействия фолата натрия с полисахаридами исследованы методом ИК-спектроскопии на примере функционализированных фолатом натрия наночастиц золота с адсорбционным слоем полисахаридов и представлены на рис. 4. Взаимодействие фолата натрия с НЧ AuПС ведёт к перестройке водородных связей в спектре НЧ Au-ПС-FNa. Как видно из спектра, имеет место усиление интенсивности водородно-связанного NH колебания на  $3450$  и  $3473$   $\text{cm}^{-1}$ , ослабление и низкочастотный сдвиг контура спектра водородно-связанного OH колебания; происходит усиление COOH колебаний на  $1730$   $\text{cm}^{-1}$  и деформационных водородных связей OH в области  $650-770$   $\text{cm}^{-1}$ . Анализируя полученные данные, можно сде-

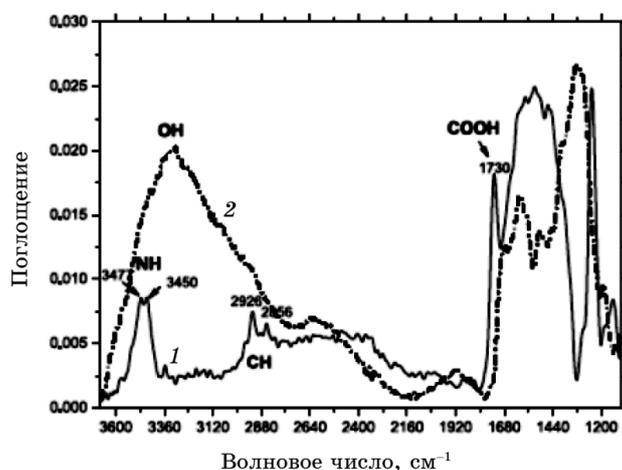
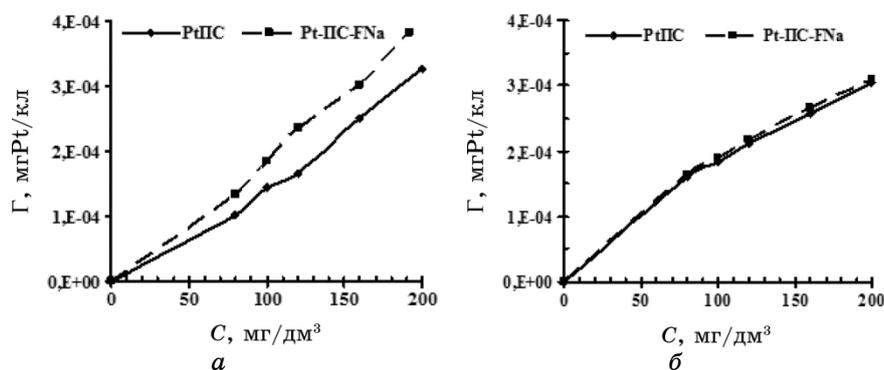


Рис. 4. ИК-спектры НЧ Au-ПС-FNa (кривая 1) и FNa (кривая 2).

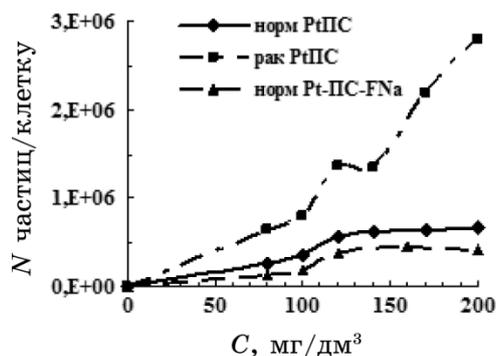
лать вывод о том, что взаимодействие между НЧ Au-ПС и FNa происходит по электростатическому механизму между карбоксильными группами ПС и аминогруппами FNa.

Эффективность агрегации наночастиц PtПС и Pt-ПС-FNa с клетками рака крови изучали на основе методов исследования гетерокоагуляции (коллоидопоглощения) и соответствующей кинетики цитотоксического эффекта. Результаты исследований приведены на рис. 5. Как видно, модификация фолатами наночастиц платины с адсорбционным слоем полисахаридов усиливает их агрегацию с  $FR^+$ -клетками линии *Jurkat* (см. рис. 5, а), но не приводит к такому усилению в случае агрегации с клетками линии *Namalwa*, не имеющими таких рецепторов (см. рис. 5, б).

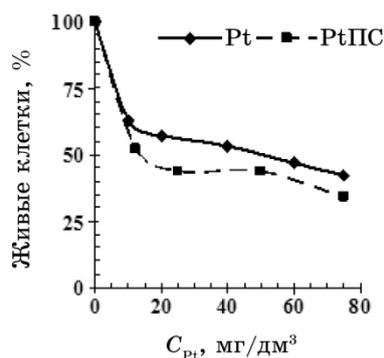
Представленные на рис. 6 результаты исследования эффективно-



**Рис. 5.** Агрегация клеток рака крови линии *Jurkat* (а) и линии *Namalwa* (б) с НЧ PtПС и НЧ Pt-ПС-FNa ( $C_{ккл} = 4,7 \cdot 10^5$  кл/см<sup>3</sup>,  $T_{конт} = 1$  час).



**Рис. 6.** Агрегация клеток рака крови линии *Namalwa* с НЧ PtПС и НЧ Pt-ПС-FNa и нормальных лимфоцитов с НЧ Pt-ПС-FNa ( $C_{ккл} = 4,7 \cdot 10^5$  кл/см<sup>3</sup>,  $T_{конт} = 1$  час).

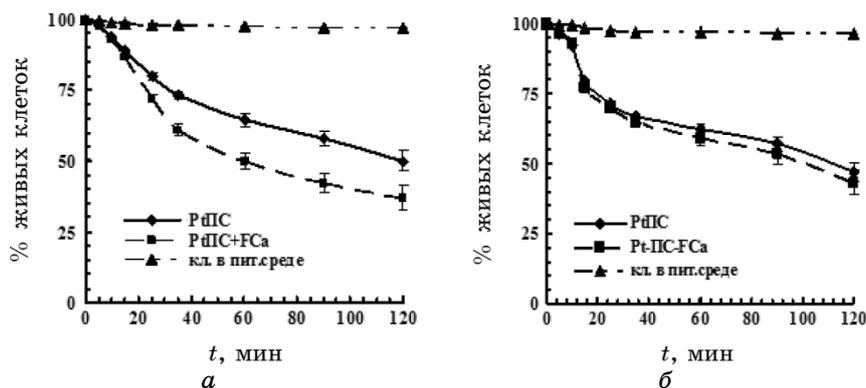


**Рис. 7.** Зависимость доли живых клеток рака яичника человека A2780 от концентрации наночастиц платины и платины с адсорбционным слоем полисахаридов ( $T_{\text{конт}} = 1$  час).

сти агрегации раковых клеток линии *Namalwa* и здоровых лимфоцитов с НЧ PtПС и с НЧ Pt–ПС–FNa показывают, что, во-первых, модифицированные полисахаридами наночастицы платины селективно взаимодействуют с такими клетками — их агрегация с раковыми клетками намного выше, чем с нормальными и, во-вторых, функционализация наночастиц фолатами усиливает этот эффект — частицы НЧ Pt–ПС–FNa агрегируют со здоровыми лимфоцитами слабее, чем с раковыми.

Один из методов исследования токсического действия препарата на клетки основан на определении индекса  $IC_{50}$ . Предварительно исследовали влияние адсорбции полисахаридов на наночастицах платины на усиление их цитотоксического эффекта — на примере клеток рака яичника линии A2780 (рис. 7). Здесь представлена зависимость доли интактных (живых) клеток A2780 от времени контакта с наночастицами платины и такими же частицами, но покрытыми адсорбционным слоем полисахаридов хлореллы. Как видно, эффективность токсического воздействия НЧ PtПС заметно выше, чем НЧ Pt — в первом случае половина клеток погибает при концентрации НЧ PtПС 16 мг/дм³, во втором — при концентрации НЧ Pt 60 мг/дм³. Как видно, адсорбционный слой ПС на поверхности НЧ платины уменьшает величину  $IC_{50}$  более чем в три раза. Причины такого эффекта могут быть связаны с отмеченными выше факторами токсического действия полисахаридов на раковые клетки и способностью полисахаридов, как анионного полиэлектролита, интенсифицировать фагоцитоз.

Аналогично, на основе подсчёта доли живых и мёртвых клеток в зависимости от времени их контакта с наночастицами (кинетика цитотоксического эффекта) исследовали токсическое действие НЧ PtПС и НЧ Pt–ПС–FСа на клетки рака крови. Соответствующие ре-



**Рис. 8.** Кинетика цитотоксического эффекта клеток рака крови линии *Jurkat* (а) и линии *Namalwa* (б) после контакта с НЧ Pt-PC и НЧ Pt-PC-FCa.

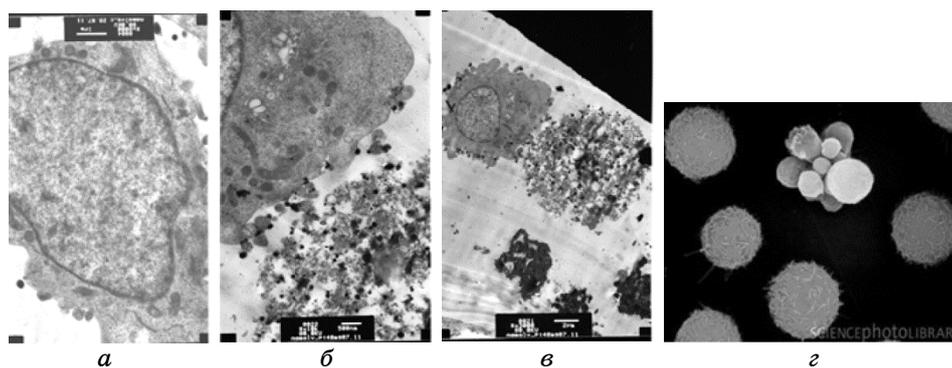
зультаты приведены на рис. 8. Данные, представленные на рис. 8, а, показывают, что функционализация фолатом наночастиц платины с полисахаридами усиливает их токсическое действие на  $FR^+$  раковые клетки *Jurkat*: 50% клеток погибает за 1 час контакта с НЧ Pt-PC-FCa, в то время как с клетками линии *Namalwa* такой же эффект достигается вдвое дольше (рис. 8, б). Как видно из данных, представленных на рис. 8, за время эксперимента все клетки в питательной среде без частиц сохраняли жизнедеятельность.

Результат действия НЧ Pt-PC-FNa на клетки линии *Namalwa* иллюстрируют ПЭМ-микрофото<sup>3</sup> на рис. 9, б, в. Как видно после 1 часа контакта с НЧ, в раковых клетках происходит нарушение ультраструктуры, деформация ядра, наружной мембраны, образование фагосом (сравните с исходной структурой клетки *Namalwa* — рис. 9, а) или же полное фрагментирование на отдельные апоптотические тельца. Последнее предположение сделано на основе сравнения с микрофото сканирующей электронной микроскопии из работы [39] (рис. 9, г), где зафиксирован апоптоз клетки лейкоцита.

#### 4. ВЫВОДЫ

Разработаны методы синтеза модифицированных фолатами натрия и кальция наночастиц платины, покрытых адсорбционным слоем полисахаридов. Показано, что модификация полисахаридами усиливает цитотоксическое действие наночастиц платины.

<sup>3</sup> Благодарим вед. инженера ИЭПОР НАН Украины Н. А. Трегубову за цитоморфологический анализ.



**Рис. 9.** ПЭМ-фотографии клетки линии *Namalwa* (а) и такой же клетки после контакта с НЧ Pt–ПС–FNa (б, в), СЭМ-микрофото апоптоза клетки лейкоцита человека (г) [39].

Определены оптимальные концентрации реагентов, условия (время, температура, порядок смешивания) для синтеза НЧ Pt–ПС–ФА. Оптимальные условия синтеза НЧ Pt–ПС–ФА установлены на основе электроповерхностных исследований формирования адсорбционного слоя полисахаридов и фолатов на поверхности НЧ.

В опытах с клетками рака крови линии *Jurkat*, имеющих фолат-рецепторы, и линии *Namalwa*, у которых их нет, экспериментально доказаны факты усиления агрегации и цитотоксического действия функционализированных фолатом натрия и кальция НЧ PtПС на клетки линии *Jurkat*. Также показано, что цитотоксическое действие НЧ Pt–ПС–ФА на эти клетки выше в сравнении с действием НЧ PtПС. Показана селективность взаимодействия НЧ Pt–ПС–ФА с раковыми клетками на фоне здоровых лимфоцитов.

Полученные результаты могут быть положены в основу разработки новых лекарственных препаратов для терапии рака на основе наночастиц платины, модифицированных полисахаридами и функционализированных фолатом.

Работа выполнена в рамках проекта № 63/Н при финансовой поддержке Целевой комплексной программы фундаментальных исследований НАН Украины «Фундаментальные проблемы наноструктурных систем, наноматериалов, нанотехнологий».

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. L. Dykman and N. Khlebtsov, *Chem. Soc. Rev.*, **41**: 2256 (2012).
2. Н. Ф. Гамалея, Г. О. Лесняк, И. В. Прокопенко, *Фотобиология и фотомедицина*, **7**, № 1–2: 67 (2007).
3. X. Huang, K. Prashant, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, *Nanomedicine*, **2**,

- № 5: 681 (2007).
4. А. Ю. Крутяков, А. А. Кудринский, А. Ю. Оленин, Г. В. Лисичкин, *Успехи химии*, **77**, № 3: (2008).
  5. E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, and M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.*, **41**: 2740 (2012).
  6. P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, *Plasmonics*, **2**: 107 (2007).
  7. B. N. Khlebtsov, V. P. Zharov, A. G. Melnikov, V. V. Tuchin, N. G. Khlebtsov, *Nanotechnology*, **17**, No. 20: 5167 (2006).
  8. D. Pissuwan, T. Niidome, and M. B. Cortie, *Journal of Controlled Release*, **149**: 65 (2011).
  9. J. Shi, Z. Xiao, N. Kamaly, and O. C. Farokhzad, *Acc. Chem. Res.*, **44**, No. 10: 1123 (2011).
  10. S. Abalde-Cela, P. Aldeanueva-Potel, C. Mateo-Mateo et al., *Journal of Royal Society Interface*, **7**: 435 (2010).
  11. L. Vigderman and E. R. Zubarev, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**: 663 (2013).
  12. R. Bhattacharya and P. Mukherjee, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**: 1289 (2008).
  13. К. Б. Яцимирский, *Проблемы бионеорганической химии* (Москва: Мир: 1976).
  14. K. Hikosaka et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **66**: 195 (2008).
  15. P. V. Asharani, Xinyi Ng, M. P. Hande, and S. Valiyaveetil, *Nanomedicine*, **5**, No. 1: 51 (2010).
  16. J. A. Kralovec, *Chlorella Composition Having High Molecular Weight Polysaccharides and Polysaccharide Complexes* (Patent US №6974576) (13.12.2005).
  17. A. Komiyama and I. Umezawa, *Acidic Polysaccharide CH-1 Isolated from Chlorella Pyrenoidosa and the Use Thereof* (Patent US №4533548) (06.08.1985).
  18. S. Misra, B. P. Toole, and S. Ghatak, *J. Bio. Chem.*, **281**, No. 46: 34936 (2006).
  19. В. Р. Эстрела-Льопис, Т. И. Бородинова, И. Н. Юркова, *Коллоидно-химические основы нанонауки* (Киев: Академперіодика: 2005), т. 8, с. 238.
  20. A. S. Daba and O. U. Ezeronye, *African Journal of Biotechnology*, **2**, No. 12: 672 (2003).
  21. A. H. Xu, H. S. Chen, B. C. Sun, X. R. Xiang, Y. F. Chu, F. Zhai, and L. C. Jia, *World J. Gastroenterology*, **9**, No. 11: 2424 (2003).
  22. E. M. Hodnett, J. Amirmoazzami, and J. Tai, *Journal of Medicinal Chemistry*, **21**, No. 7: 652 (1978).
  23. M. A. Yessine and J. C. Leroux, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**: 999 (2004).
  24. W. Yu, N. Zhang, and C. Li, *Cure Pharm. Des.*, **15**, No. 32: 3826 (2009).
  25. В. Ц. Шапот, *Биохимические аспекты опухолевого роста* (Москва: Медицина: 1975), с. 304.
  26. С. Осинский, П. Ваупель, *Микрофизиология опухолей* (Киев: Наукова думка: 2009), с. 108.
  27. B. A. Kamen and A. Capdevila, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5983 (1986).
  28. J. Sudimack and R. J. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**: 147 (2000).
  29. Z. Zhang, J. Jia, Y. Lai, Y. Ma, J. Weng, and L. Sun, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**: 5528 (2010).
  30. V. Dixit, J. Bossche, D. M. Sherman, D. H. Thompson, and R. P. Andres, *Bioconjugate Chem.*, **17**, No. 3: 603 (2006).
  31. C. J. Xiong, X. H. Yuan, J. D. Zhou, Y. Chen, F. H. Chen, and L. X. Xu, *African J. Pharm. Pharmacol.*, **7**, No. 12: 666 (2013).

32. E. Schneider, M. Chavali et al., *Cancer Research*, **72**, No. 8, Suppl. 1 (2012); doi: 10.1158/1538-7445.AM2012-1956.
33. S. Mandal, A. Bonifacio et al., *Colloid Polym. Sci.*, **289**, No. 3: 269 (2001).
34. А. А. Миронов, *Методы электронной микроскопии в биологии и медицине* (Санкт-Петербург: Наука: 1994).
35. P. S. Low and S. A. Kularatne, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, No. 3: 256 (2009).
36. И. Я. Захарова, Л. В. Косенко, *Методы исследования полисахаридов микроорганизмов* (Киев: Наукова думка: 1982), с. 36.
37. В. Р. Естрела-Льопис и др., *Дослідження коагуляції у плазмі крові наночастинок та нанокристалів золота і платини та їх взаємодії з трансформованими клітинами певного онкогенезу з метою використання в онкотерапії* (звіт про науково-дослідну роботу № 0107U007693) (2009).
38. Y. Cheng and W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, No. 23: 3099 (1973).
39. *Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy. Apoptosis in Cancer* (Eds. G. G. Chen and P. B. S. Lai) (Dordrecht, The Netherlands: Springer Science+Business Media BV: 2009).