

І.М. Тодор
Н.Ю. Лук'янова
Ю.О. Тимовська
В.М. Півнюк
В.Ф. Чехун

Інститут
експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: медикаментозна
резистентність, ліпосомальний
доксорубіцин, ендочитоз, P-гр.

ВПЛИВ ДОКСОРУБІЦИНУ В ЛІПОСОМАЛЬНІЙ ФОРМІ НА ПУХЛИНИ З ФЕНОТИПОМ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ

Мета: дослідити вплив ліпосомальної форми доксорубіцину (LDox) на пухлини з фенотипом медикаментозної резистентності та визначити його окремі механізми. **Об'єкти і методи:** резистентна до вільної форми доксорубіцину (Dox) карцинома Герена щурів; клітини раку молочної залози людини MCF-7 та її резистентної до Dox сублінії MCF-7/Dox. **Методи експериментальної онкології;** культивування клітин; гістологічний, імуноцитохімічний; світлова та лазерна конфокальна мікроскопія. **Результати:** LDox достовірно гальмує ріст резистентного до вільного Dox штаму карциноми Герена та призводить до патоморфозу паренхіми пухлин. Вільний Dox потрапляє в цитоплазму пухлинних клітин шляхом дифузії, ліпосомальний — шляхом ендочитозу. LDox не індукує експресію P-гр в пухлинних клітинах і таким чином оминає активне виведення з цитоплазми за допомогою цього білка. **Висновки:** LDox має переваги порівняно з вільною формою цитостатика стосовно накопичення і впливу на злоякісні клітини. Він може тривало акумулюватися як у цитоплазмі, так і у ядрі пухлинних клітин з фенотипом медикаментозної резистентності.

ВСТУП

Застосування цитостатичної терапії призводить до поліпшення безпосередніх і віддалених результатів лікування хворих зі злоякісними новоутвореннями. Але більшості злоякісних пухлин тією чи іншою мірою притаманна первинна медикаментозна резистентність [1]. Рак молочної залози (РМЗ), хоч і вважається пухлиною, чутливою до цитостатичної терапії, не є винятком з цього правила [2]. Кількість померлих від РМЗ у всьому світі за рік (а це більше 450 тис. жінок) демонструє, що проблема лікування цього захворювання далека від вирішення. Тому питання подолання резистентності пухлинних клітин (ПК) до цитостатичних препаратів є одним із пріоритетних в експериментальній і клінічній онкології.

Використання здобутків біо- та нанотехнологій дозволяє долати природні перешкоди, зокрема феномен первинної медикаментозної резистентності, у формуванні якого задіяні численні механізми, пов'язані як зі зменшеним, сповільненим проходженням цитостатиків через мембрану ПК, так і з прискореним, посиленням їх виведенням із цитоплазми. Накопичений масив знань про активацію систем детоксикації та механізми відновлення пошкодженої ДНК, шляхи уникнення ПК апоптозу, генетичні та епігенетичні зміни в ПК стає підґрунтям для розроблення нових методів подолання медикаментозної резистентності [3, 4].

Антрациклінові антибіотики є одними з найактивніших цитостатичних препаратів, які застосовують у хворих на РМЗ [5]. Але навіть використання антрациклінвмісних режимів поліхіміотера-

пії не завжди призводить до бажаного результату [6, 7], тому актуальним є пошук шляхів підвищення їх ефективності. Одним із таких способів є заміна вільної форми доксорубіцину (Dox) на ліпосомальну.

Ліпосоми набувають все більшого визнання у світі як носії медикаментозних речовин загалом і цитостатиків зокрема [8, 9]. Мембрани ліпосом складаються з природних фосфоліпідів, що дозволяє їм з'єднуватися з мембранами клітин, що в свою чергу призводить до внутрішньоклітинної доставки вмісту ліпосом. Цитостатики, інкапсульовані в ліпосоми, потрапляють в цитоплазму ПК шляхом ендочитозу [10]. Слід зазначити, що майже всі проведені дослідження з вивчення механізмів доставки і накопичення цитостатиків, інкапсульованих у ліпосоми, були проведені на чутливих до цитостатиків моделях [11, 12]. Результати, отримані в клінічних дослідженнях, показали, що ліпосомальна форма доксорубіцину (LDox) ефективна у хворих зі злоякісними новоутвореннями [13–15]. Крім того, встановлено ефективність цієї форми препарату у хворих із резистентними до LDox пухлинами [16–18].

Нас зацікавили механізми впливу LDox на пухлини з фенотипом медикаментозної резистентності. Визначення окремих механізмів і становило мету проведеного нами дослідження. Вивчено проникну здатність ліпосомальної форми цитостатика в цитоплазму ПК, резистентних до Dox, та досліджено механізм проникнення; оцінено ефективність терапевтичного впливу LDox на пухлини, резистентні до вільної форми препарату.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

На основі даних, отриманих із літературних джерел та напрацьованих в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України, ми висунули гіпотезу, що за допомогою LDoх можна подолати медикаментозну резистентність до Doх. Для підтвердження цього припущення спочатку провели експериментальне дослідження з визначення ефективності застосування LDoх у тварин. 24 шурам-самцям лінії Wistar з масою тіла 150–200 г розведення експериментальної бази ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України було перещеплено клітини резистентного до Doх штаму карциноми Герена. Усі етапи дослідження *in vivo* проводили, дотримуючись правил Комісії з етичних норм роботи з експериментальними тваринами. Як модель пухлинного росту використовували перещеплену пухлину резистентного до Doх штаму карциноми Герена [19]. Усім шурам вказану пухлину перещепили шляхом підшкірного введення 0,5 мл 22% зависі пухлинної тканини з дотриманням правил асептики.

На 11-ту добу після перещеплення у всіх шурів визначали об'єм пухлини. Після цього тварин розподілили на 3 групи. Тваринам першої групи (основної) вводили LDoх у дозі 2,5 мг/кг; другої (контроль № 1) — фізіологічний розчин (0,9%) хлориду натрію; третьої (контроль № 2) — вільний Doх у дозі 2,5 мг/кг. Усі досліджувані групи були тотожними за об'ємом (розміром) пухлин. Препарати вводили внутрішньочеревно (1 раз на 2 доби) на 11; 13 та 15-й день після перещеплення пухлини. В ці ж терміни визначали об'єм пухлини. Тривалість спостереження за тваринами всіх груп — 18 діб. На 18-ту добу визначали кінцевий об'єм та масу пухлини.

Оцінювали динаміку росту пухлин, визначаючи ортогональні розміри штангенциркулем з точністю до 0,1 мм. Після завершення експерименту масу кожної пухлини визначали за допомогою торсійних техніко-хімічних ваг 2-го класу типу WT-40 з максимальним навантаженням 40 г.

Для морфологічного дослідження брали пухлинну тканину у всіх тварин з кожної групи. Гістологічні препарати (зрізи товщиною 3–6 мкм) готували за загальноприйнятою методикою та забарвлювали гематоксиліном та еозином. Морфологічні дослідження тканини здійснювали за допомогою мікроскопа Laborlux S (Leitz).

Наступним етапом було вивчення механізмів проникнення та накопичення в цитоплазмі ПК, резистентних до вільного Doх, ліпосомальної форми препарату. Дослідження були проведені на клітинах лінії MCF-7 (PM3 людини) та її сублінії MCF-7/Doх, резистентної до цитотоксичного впливу вільного Doх. Резистентна сублінія була отримана з вихідної лінії у відділі механізмів протипухлинної терапії ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували в середовищі Dulbecco

ISCOV («Sigma», США) з додаванням 10% ембріональної сироватки телят («Sigma», США) у зволоженої атмосфері з 5% CO₂ при температурі 37 °С; пересівали двічі на тиждень, щільність посіву становила 2–4 • 10⁴ клітин/см² поверхні. Пересів клітин здійснювали, коли 50% поверхні ємності для культивування були зайняті клітинами.

Для дослідження процесу ендоцитозу вихідні й резистентні до Doх клітинні лінії культивували при стандартних умовах протягом 1 год із цитохалазином В («DakoCytomation», Данія), який додавали в культуральне середовище в концентрації 5 мкг/мл. Потім проводили заміну поживного середовища і подальше культивування клітин із препаратом Doх або LDoх протягом 4 год при температурі 37 °С у зволоженої атмосфері з 5% CO₂. Після цього фіксували клітини у суміші метанол/ацетон (1/1), відмивали і поміщали у Faramount Aqueous Mounting Medium («DakoCytomation», Данія). Оскільки Doх належить до препаратів, які мають здатність до власної флуоресценції при довжині хвилі збудження $\lambda_{ex} = 540$ нм і хвилі емісії $\lambda_{em} = 590$ нм, то знаходження і розподіл Doх і LDoх в клітинах ми вивчали за допомогою лазерного конфокального мікроскопа LSM 510 META («CARL ZEISS», Німеччина). Експресію Р-глікопротеїну визначали з використанням моноклональних антитіл і системи візуалізації EnVision («DakoCytomation», Данія).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При проведенні досліджень *in vivo* на 18-ту добу після перещеплення резистентного до Doх штаму карциноми Герена у тварин основної та контрольної груп були різні показники об'єму та маси трансплантованої пухлини. Дані щодо кінетики росту пухлини в основній та контрольних 1-й та 2-й (№ 1 та № 2) групах в різні проміжки часу представлені на рис. 1.

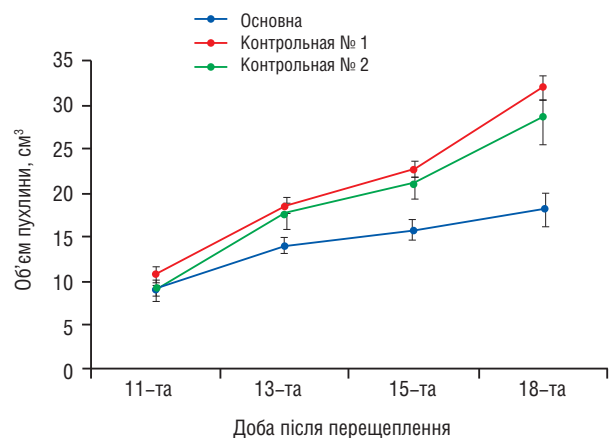


Рис. 1. Динаміка росту резистентного штаму карциноми Герена шурав лінії Wistar в основній і контрольних групах

Як свідчать дані рис. 1 і табл. 1, на початку дослідження (11-та доба після перещеплення пухлини)

групи були тотожними за об'ємом первинної пухлини ($p > 0,05$). Уже на 13-ту добу середній об'єм пухлини в основній групі був меншим порівняно з обома групами контролю ($p < 0,05$). На 18-ту добу достовірність відмінностей між основною і контрольними групами була найбільшою ($p < 0,01$). Між контрольними групами відмінностей не виявлено ($p > 0,05$). Результати визначення середньої маси пухлин наведено також в табл. 1.

Таблиця 1

Група	Об'єм і маса пухлини залежно від проведеної терапії				Маса пухлини (г)
	Об'єм пухлини (см ³)				
	11-та доба	13-та доба	15-та доба	18-та доба	
Основна	9,1±0,7	13,9±0,7	15,7±0,9	18,1±1,3	27,5±2,2
Контроль-на № 1	10,8±1,2	18,3±1,8*	22,6±1,9*	31,9±3,2**	42,9±2,5*
Контроль-на № 2	9,0±0,9	17,8±0,9*	21,1±1,1*	28,7±1,8**	41,5±1,5*

Примітка: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ у порівнянні з основною групою.

За значенням середньої маси пухлин також встановлено достовірну різницю між основною та обома контрольними групами ($p < 0,05$). Між контрольними групами № 1 і № 2 статистично значущої різниці не виявлено. Після визначення об'єму та маси пухлини в основній групі та контрольній № 2 обчислили відсотки гальмування пухлинного росту. Тварини контрольної групи № 1 цитостатичної терапії не отримували, тому відсоток гальмування не визначали. Результати наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Групи	Відсоток гальмування пухлинного росту залежно від проведеної терапії			
	Відсоток гальмування			
	за об'ємом пухлини			за масою пухлини
	Час (доба)			Час (доба)
	13-та	15-та	18-та	18-та
Основна	24,0±1,8*	30,5±2,0*	43,3±3,2*	36,0±2,9*
Контрольна	2,7±0,2	6,6±0,7	10,0±0,8	3,3±0,4

Примітка: * $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою.

Як свідчать дані табл. 2, відсоток гальмування об'єму пухлини вищий на 33,3% при застосуванні ліпосомальної форми, порівняно з вільним Dox, відсоток гальмування маси пухлини в основній групі перевищує аналогічний показник у контрольній групі № 2 на 32,7% ($p < 0,05$).

Після того як визначили відсоток гальмування пухлинного росту, з усіх пухлин було виготовлено гістологічні препарати та проведено патоморфологічне дослідження. Морфологічна структура карциноми Герена зі сформованою медикаментозною резистентністю до Dox у групах шурів, які отримували 0,9% розчин хлориду натрію (контроль № 1), вільну (контроль № 2) та ліпосомальну (основна група)

форми Dox, була відмінною. У контрольній групі № 1 у всіх препаратах була представлена структура інтактної пухлини. У контрольній групі № 2 в 1 (12,5%) пухлині патоморфологічних змін, характерних для лікувального патоморфозу (ЛП), не виявлено, в 5 (62,5%) — визначався ЛП I ступеня (рис. 2), в 2 (25,0%) — ЛП II ступеня. В основній групі ступінь патоморфологічних змін був вищим (рис. 3), ніж у контрольній групі № 2. Паренхіма складалася зі світлих ПК зі щільними дрібними ядрами та ділянок некрозу. В одних випадках площа некрозу становила 20–30% від усєї площі препарату, в інших — відзначали масивні зони некротичного розплавлення. В 1 (12,5%) пухлині зареєстровано ЛП I ступеня, в 4 (50%) пухлинах — ЛП II ступеня, в 3 (37,5%) — ЛП III ступеня. У 6 (75%) пухлинах виявляли заміщення некротичних ділянок сполучною тканиною. Встановлено, що на 18-ту добу після перещеплення ракових клітин рівень морфологічних змін у пухлинах тварин основної групи перевищував відповідні у тварин контрольної групи № 2 ($p < 0,05$).

Ми виявили, що при застосуванні LDox можна досягти ефекту щодо резистентних до вільного Dox пухлин: загальмувати ріст пухлин та викликати не-

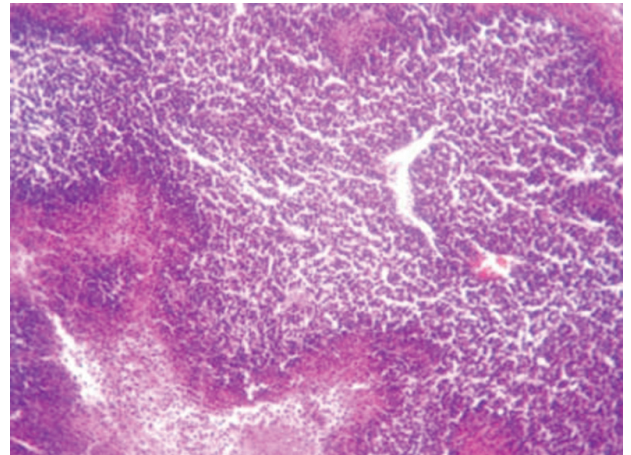


Рис. 2. Резистентний до Dox штаб карциноми Герена. Ознаки ЛП 0–I ступеня після терапії вільною формою Dox. $\times 200$

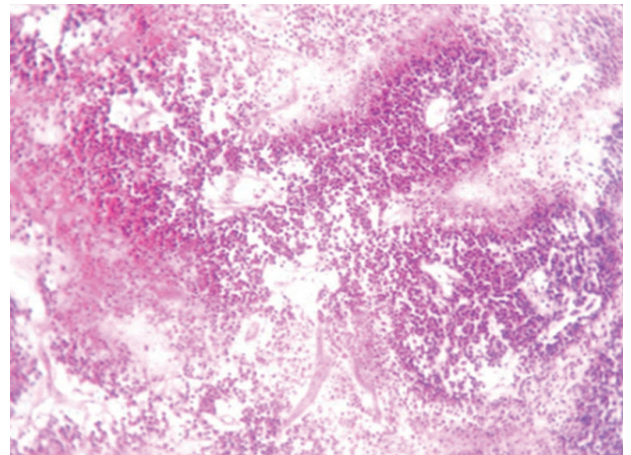


Рис. 3. Резистентний до Dox штаб карциноми Герена. Ознаки ЛП III ступеня після терапії LDox. $\times 200$

критичні зміни в її паренхімі. M.G. Zyкова та співавтори [20] дослідили вплив LDox на резистентний штаб карциноми легені Lewis та досягли гальмування росту пухлини на 40,0%, тобто також продемонстрували ефективність LDox для гальмування росту пухлин, резистентних до вільної форми препарату. Таким чином, в експериментальних дослідженнях на різних модельних пухлинах підтверджено висунуту гіпотезу, що за допомогою LDox можна долати медикаментозну резистентність до вільного Dox.

Результати цієї серії досліджень стали підґрунтям для вивчення механізмів проникнення та накопичення LDox у резистентних до вільної форми препарату ПК (сублінії клітин PM3 MCF-7/Dox). Як відомо, препарати, розміщені в ліпосомах, проникають у цитоплазму клітин шляхом ендоцитозу [20–22], тоді як вільні форми цитостатиків — шляхом простої дифузії. Для визначення інтенсивності накопичення Dox та LDox у цитоплазмі чутливих і резистентних клітин MCF-7 та MCF-7/Dox (шляхом дифузії чи ендоцитозу) ми провели дослідження з блокуванням процесу ендоцитозу за допомогою блокатора останнього — цитохалазину В. Механізм актинової регуляції ендоцитозу складається з кількох ланок [23]. Актиновий цитоскелет функціонує на всіх стадіях ендоцитозу: при утворенні ендоцитозного комплексу, його відокремленні від цитоплазматичної мембрани, при наступному переміщенні ендосом у клітині. Деякі стадії ендоцитозу потребують значної локальної полімеризації актину. На пізніх стадіях дозрівання ендоцитозних везикул полімеризація актину сприяє відштовхуванню ендосом від плазматичної мембрани. Інгібітори полімеризації актину призводять до порушення ендомембранних компартментів і блокують процес ендоцитозу. Цитохалазин В належить до інгібіторів полімеризації актину, перешкоджає з'єднанню філаментів з позитивним кінцем актинового ланцюга і таким чином блокує приєднання нових мономерів актину, у результаті чого припиняється зростання актинового ланцюга.

Ми встановили, що блокування ендоцитозу не впливає на накопичення Dox клітинами вихідної лінії MCF-7 (рис. 4) і резистентної сублінії MCF-7/Dox (рис. 5). Після 4 год інкубації з препаратом реєстрували флуоресценцію Dox у клітинах. Цей факт також вказує на те, що вільна форма Dox надходить до цитоплазми шляхом пасивної дифузії. Але розподіл Dox в чутливих і резистентних клітинах був різним: у клітинах лінії MCF-7 препарат був сконцентрований в ядрі клітини, виявляли невеликі скупчення препарату в цитоплазмі, тоді як в клітинах сублінії MCF-7/Dox фіксували незначну дифузну флуоресценцію в цитоплазмі. Це вказувало на те, що вільний Dox проникає шляхом дифузії як у чутливі, так і в резистентні клітини. Відомо, що цитотоксичний ефект цього препарату реалізується на рівні ядра: проникаючи в ядро ПК, Dox порушує опосередкований топоізомераую-ІІ механізм

відновлення ДНК, а вільні радикали, які утворюються внаслідок дії цього цитостатика, призводять до розриву ДНК [24]. Виходячи із сукупних результатів дослідження, ми також встановили, що, хоча Dox проникає в чутливі та резистентні клітини шляхом дифузії, ефективним він є лише відносно чутливих клітин.

При дослідженні накопичення LDox клітинами MCF-7 під дією цитохалазину В виявлено різке зниження рівня флуоресценції: лише невеликі, слабо визначені контури клітин візуалізуються за допомогою конфокального мікроскопа (рис. 6). Те саме спостерігали відносно резистентних клітин MCF-7/Dox (рис. 7). Якщо без впливу цитохалазину В для резистентних клітин характерна досить виражена дифузна флуоресценція цитоплазми та поява значних за розміром і більш яскравих ділянок флуоресценції у перинуклеарному просторі, то під дією блокатора різко знижується рівень світіння LDox в клітинах.

Dox потрапляє до цитоплазми ПК, як зазначено вище, шляхом дифузії через плазматичну мембрану, але з резистентних клітин препарат швидко виводиться за допомогою P-gr [25, 26]. Переваги ліпосомальної форми препарату, у першу чергу, полягають в особливостях його трансмембранного транспорту: шляхом ендоцитозу з формуванням ендосом, що знижує безпосередній зв'язок LDox з P-gr. С. Riganti та співавтори [27] встановили, що LDox не тільки менше виводиться з цитоплазми за допомогою P-gr, а ще й ліпосоми, у свою чергу, пригнічують насосну функцію цього трансмембранного білка-транспортера.

За допомогою імуноцитохімічного методу і конфокальної мікроскопії ми провели дослідження експресії P-gr під впливом Dox і LDox. Після культивування клітин лінії MCF-7 протягом 12 год з Dox у 80,0% клітин відзначали експресію P-gr (рис. 8, а), тоді як взаємодія цих клітин з LDox не призводила до появи експресії P-gr ні через 24 год, ні через 48 год інкубації (рис. 8, б). Таким чином, ми встановили, що Dox у вільній формі, який потрапляє в клітину шляхом дифузії, активує енергозалежний трансмембранний білок-транспортер P-gr, внаслідок чого частково виводиться з клітини. При застосуванні препарату у ліпосомальній формі експресія P-gr не проявлялася.

Результати, отримані в проведених раніше в нашому відділі дослідженнях [10, 23], продемонстрували, що як для чутливих до Dox клітин вихідної лінії MCF-7, так і для клітин резистентної сублінії MCF-7/Dox характерне не тільки підвищене накопичення, а й більш тривала акумуляція в цитоплазмі та ядрі ПК LDox, ніж Dox, що таким чином призводить до посилення цитотоксичної дії препарату.

Отже, ми встановили, що LDox ефективно гальмує ріст *in vivo* резистентних до Dox пухлин (наприкладі резистентного штабу карциноми Герена). Завдяки ендоцитозу Dox проникає в цитоплазму та акумулюється в ядрі чутливих і резистентних клі-

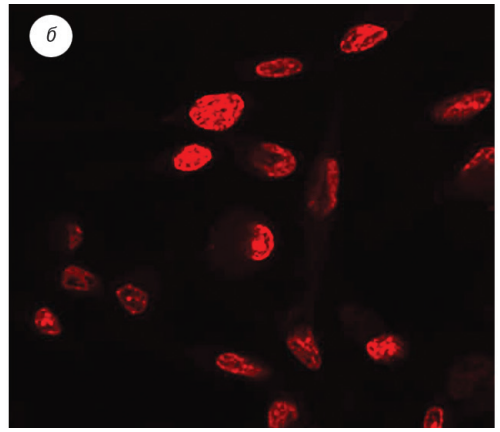
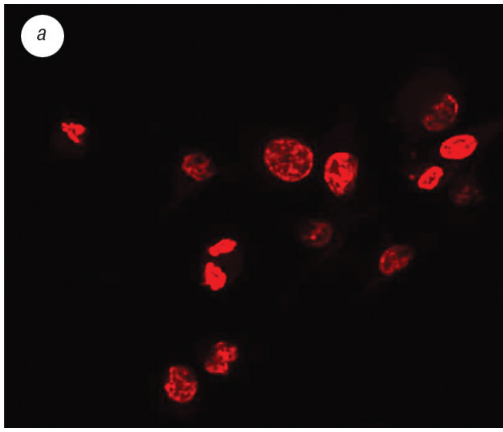


Рис. 4. Розподіл Dox у клітинах лінії MCF-7: *a* — без дії цитохалазину В; *б* — під впливом цитохалазину В. $\times 400$

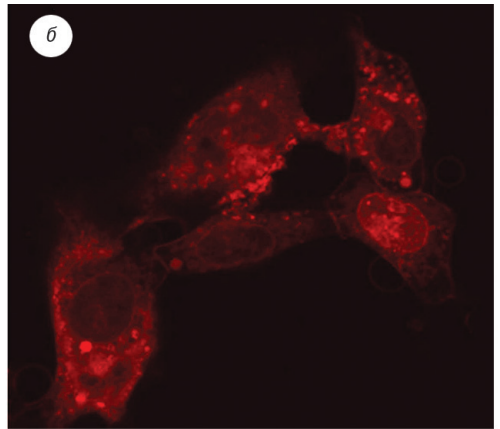
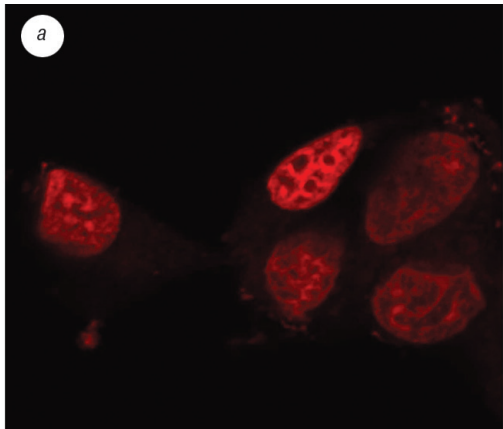


Рис. 5. Розподіл Dox у клітинах лінії MCF-7/Dox: *a* — без дії цитохалазину В; *б* — під впливом цитохалазину В. $\times 200$

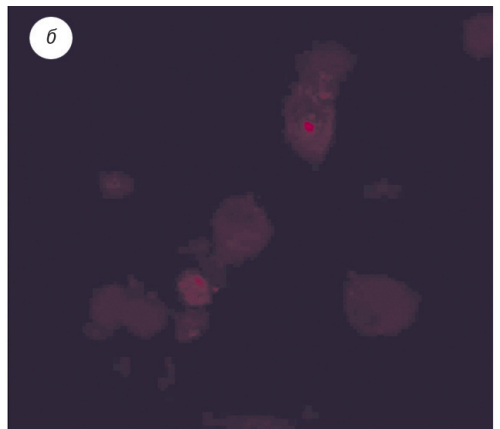
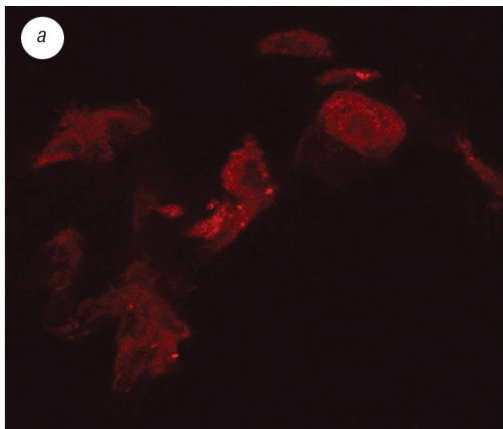


Рис. 6. Розподіл LDox у клітинах лінії MCF-7. *a* — без дії цитохалазину В; *б* — під впливом цитохалазину В. $\times 400$

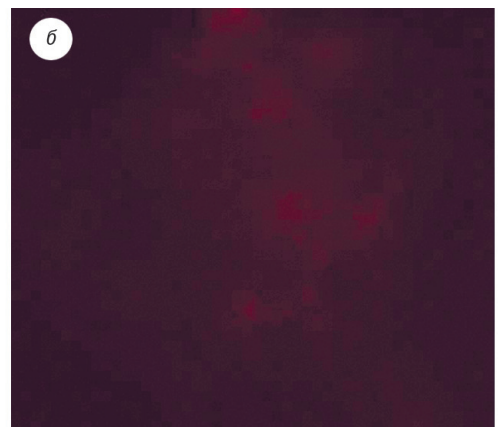
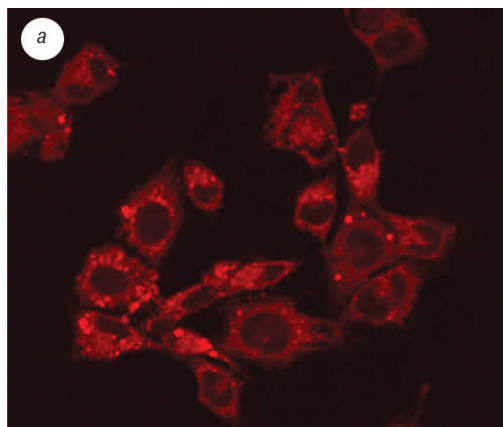


Рис. 7. Розподіл LDox у клітинах лінії MCF-7/Dox. *a* — без дії цитохалазину В; *б* — під впливом цитохалазину В. $\times 400$

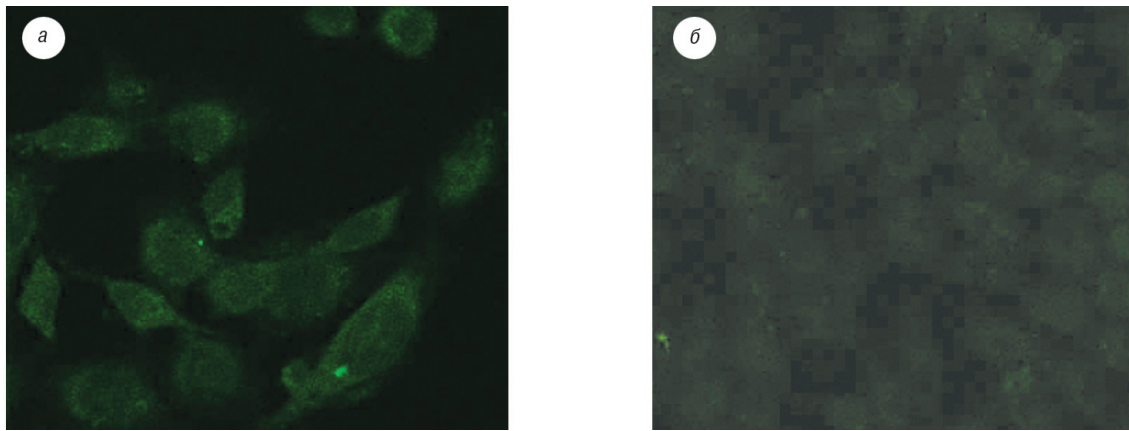


Рис. 8. Зміна експресії Р-гр у клітинах РМЗ MCF-7 при культивуванні з Dox (а) та LDox (б) протягом 24 год. $\times 400$

тин лінії MCF-7 та MCF-7/Dox, успішно уникаючи активного виведення з цитоплазми трансмембранним білком-транспортером Р-гр.

ВИСНОВКИ

На основі даних, отриманих у результаті проведеного нами дослідження, зроблено такі висновки:

1. LDox на 33,3% більше гальмує ріст резистентного до вільного Dox штаму карциноми Герена та в 37,5% призводить до патоморфологічної регресії паренхіми пухлин, що відповідає III ступеню лікувального патоморфозу.

2. LDox проникає в чутливі клітини лінії MCF-7 і резистентні клітини сублінії MCF-7/Dox шляхом ендцитозу та акумулюється переважно в ядрі клітин.

3. Вільна форма Dox, яка потрапляє в клітини лінії MCF-7 шляхом дифузії, активує енергозалежний трансмембранний білок-транспортер Р-гр, внаслідок чого Dox виводиться з клітин.

4. LDox не призводить до появи експресії білка Р-гр в досліджуваних клітинах лінії MCF-7.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002; **53**: 615–27.
- Wind NS, Hoken I. Multidrug resistance in breast cancer: from *in vitro* models to clinical studies. *Int J Breast Cancer* 2011; **96**: 12–24.
- Чехун ВФ, Микитенко ДО, Лук'янова НЮ. Корекція порушень метилювання ДНК як можливий шлях модуляції лікарської резистентності злоякісних клітин. *Укр біохім журн* 2006; **78** (6): 5–14.
- Kutanzi KR, Yurchenko OV, Chekhun VF, et al. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenet* 2011; **2**: 171–85.
- Семиглазов ВВ, Топузов ЭЭ. Рак молочной железы. Москва: МЕДпресс-информ, 2009. 172 с.
- Hortobagyi GN, Pivot X, Asmar L. Special lecture: Anthracycline-resistant breast cancer. *Breast Cancer* 1997; **4** (4): 221–7.
- Pivot X, Asmar L, Buzdar AU, et al. A unified definition of clinical anthracycline resistance breast cancer. *Br J Cancer* 2000; **82** (3): 529–34.
- O'Shaughnessy J. Liposomal anthracyclines for breast cancer: Overview Joyce. *Oncologist* 2003; **8** (2): 1–2.
- Кулик ГИ, Пономарева ОВ, Король ВИ, Чехун ВФ. Токсичность и противоопухолевая активность липосомаль-

ной лекарственной формы доксорубина. *Онкология* 2004; **6** (3): 207–10.

10. Rusetskaya NV, Khariton N, Yurchenko OV, Chekhun VF. Distribution and accumulation of liposomal form of doxorubicin in breast cancer cells of MCF-7 line. *Exp Oncol* 2011; **33** (2): 78–80.

11. Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD. The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods Enzymol* 2005; **391**: 71–97.

12. Andresen TL, Jensen SS, Jorgesen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog Lipid Res* 2005; **44** (1): 68–97.

13. Chao TC, Wang WS, Yen CC, et al. A dose-escalating pilot study of sterically stabilized, pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox) in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Invest* 2003; **21** (6): 837–47.

14. Ranson MR, Carmichael J, O'Byrne K, et al. Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: results of a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 1997; **15** (10): 3185–91.

15. Reynolds JG, Geretti E, Hendriks BS, et al. HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; **262** (1): 1–10.

16. Al-Batran S-E, Güntner M, Pauligk C, et al. Anthracycline rechallenge using pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis using individual data from four prospective trials. *Br J Cancer* 2010; **103** (10): 1518–1523.

17. Півнюк ВМ, Тимовська ЮО, Пономарьова ОВ та ін. Використання ліпосомальних форм препаратів у хворих на резистентний до доксорубіну рак молочної залози. *Онкологія* 2007; **10** (2): 121–4.

18. Тимовська ЮО, Півнюк ВМ, Олійніченко ГП, Чехун ВФ. Первинна медикаментозна резистентність до антрациклінових антибіотиків у хворих з місцево-розповсюдженим раком молочної залози та можливості її подолання. *Онкологія* 2010; **12** (2): 154–9.

19. Чехун ВФ, Тодор ИН, Соляник ГИ, Кулик ГИ, Триндяк ВП. Особенности окислительного фосфорилирования и энергетического статуса чувствительной и резистентной к доксорубину карциномы Герена. *Эксп Онкол* 2000; **22** (4): 195–9.

20. Zykova MG, Medvedeva NV, Torkhovskaya TI, et al. Influence of doxorubicin inclusion into phospholipid nanoformulation on its antitumor activity in mice: increased efficiency for resistant tumor model. *Exp Oncol* 2012; **34**: 12–24.

21. Lee KD, Hong K. Recognition of liposome by cells: *in vitro* building and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1103**: 85–97.

22. Pollock S, Antrobus R, Newton L, et al. Uptake and trafficking of liposomes to the endoplasmic reticulum. *FASEB J* 2010; **24** (6): 1866–78.

23. **Rusetskaya NV, Khariton NG, Yurchenko OV, Naleskina LA, Chekhun VF.** Features of liposomal doxorubicin accumulation and distribution in tumor cells of human breast cancer. Materials of international conference «Tumor and host: novel aspects and old problems». *Exp Oncol* 2010; **32** (3): 24.

24. **Smythe E, Ayscough KR.** Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci* 2006; **119**: 4589–98.

25. **Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al.** Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenomics* 2011; **21** (7): 440–6.

26. **Shen F, Chu S, Bence AK, et al.** Quantitation of Doxorubicin Uptake, Efflux, and Modulation of Multidrug Resistance (MDR) in MDR Human Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; **324** (1): 95–102.

27. **Riganti C, Voena C, Kopecka J.** Liposome-encapsulated doxorubicin reverses drug resistance by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells. *Mol Pharm* 2011; **8** (3): 683–700.

THE EFFECT OF LIPOSOMAL DOXORUBICIN FORM ON DRUG RESISTANT TUMOR PHENOTYPE

I.M. Todor, N.Y. Lukyanova, Y.O. Tymovska, V.M. Pivnyuk, V.F. Chekhun

Summary. Objective: to investigate the influence of liposomal form of doxorubicin (LDox) on tumor phenotype of drug resistance and to determine its individual mechanisms. **Objects and methods:** Dox-resistant Guerin carcinoma rats; human breast cancer MCF-7 cells and

Dox-resistant subline MCF-7/Dox. Methods of experimental oncology, cell culture, histological, immunocytochemical; the light and laser confocal microscopy. Results: LDox significantly inhibits the growth of free Dox resistant strain Guerin carcinoma and leads to pathomorphosis of tumors parenchyma. Free Dox enters the cytoplasm of tumor cells by diffusion, liposomal — by endocytosis. Liposomal form of the drug, does not induce the expression of P-gp in tumor cells and thus bypasses the ejection from the cytoplasm by this protein. **Conclusions:** LDox form has advantages in terms of free-form cytostatic regarding the accumulation and impact on malignant cells. This leads to long-term accumulation of cytostatic as in the cytoplasm and nucleus of tumor cells with the phenotype of drug resistance.

Key words: drug resistance, liposomal doxorubicin, endocytosis, P-gp.

Адреса для листування:

Тодор І.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: todor_igor@yahoo.com

Одержано: 2.08.2013