

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОГО НАКОПЛЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА, СНАБЖЁННОГО ТАРГЕТНОЙ СИСТЕМОЙ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ИНТЕГРИН-НАПРАВЛЕННЫМ ПЕПТИДОМ

Л.В. Кострюкова, Ю.А. Терешкина, Е.Г. Тихонова, М.А. Санжаков, Д.В. Боброва, Ю.Ю. Худоклинова*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: hudoklinova@mail.com

Использование химиопрепаратов, содержащих адресные системы доставки, представляет собой перспективное направление повышения эффективности лечения глиобластомы. В качестве мишеней рассматриваются специфические белки, экспрессия которых на поверхности опухолевых клеток увеличивается. Таким белком является интегрин $\alpha_v\beta_3$, который эффективно связывает циклический пептид Арг-Гли-Асп (cRGD). В данной работе исследована фосфолипидная композиция доксорубина (Dox), снабжённая cRGD пептидом. Размер частиц композиции составлял $43,76 \pm 2,09$ нм, ζ -потенциал соответствовал $4,33 \pm 0,54$ мВ. Dox практически полностью встраивается в наночастицы ($99,7 \pm 0,58\%$). При изучении высвобождения лекарства в зависимости от кислотности среды было установлено повышенное его высвобождение в кислой среде pH 5,0 (около $35 \pm 3,2\%$). Оценка клеточного накопления показала повышение общего накопления и интернализации Dox в составе фосфолипидных наночастиц с адресным вектором в $\sim 1,4$ раза по сравнению со свободной формой. При этом на линии клеток HeLa (не экспрессирующих интегрин $\alpha_v\beta_3$) подобного эффекта не наблюдалось. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования циклического RGD пептида в доставке Dox в клетки глиобластомы и целесообразности дальнейшего исследования механизма действия всей композиции в целом.

Ключевые слова: глиоблостома; фосфолипидные наночастицы; cRGD; интегрин $\alpha_v\beta_3$; химиотерапия; доксорубин

DOI: 10.18097/PBMC20226806437

ВВЕДЕНИЕ

Глиоблостома (ГБМ) — астроцитома IV степени по ВОЗ — является наиболее распространённым и злокачественным новообразованием головного мозга у взрослых. Несмотря на различные современные методы лечения, общая выживаемость пациентов остаётся низкой, а частота рецидивов опухоли остаётся высокой [1]. Одним из методов лечения ГБМ является химиотерапия, однако этот метод вызывает тяжёлые последствия и лишь незначительно повышает выживаемость [2]. Большинство исследований направлено на таргетное лечение ГБМ [3], в контексте которого использование адресных систем доставки препаратов представляет перспективный подход.

Семейство интегринов — рецепторов клеточной адгезии — регулирует широкий спектр клеточных функций, имеющих решающее значение для инициации,

прогрессирования и метастазирования солидных опухолей [4]. Важность интегринов в некоторых типах клеток, влияющих на прогрессирование опухоли, сделала их привлекательной мишенью для терапии рака [5]. Исследования выявили сверхэкспрессию интегрина $\alpha_v\beta_3$ на клетках ГБМ и клетках сосудов опухоли, но не на нормальных клетках головного мозга [6-9]. Интегрин $\alpha_v\beta_3$ является трансмембранным рецептором для нескольких белков внеклеточного матрикса, содержащих последовательность Арг-Гли-Асп (RGD) [10].

Лигандом для интегрина $\alpha_v\beta_3$ служит циклический пептид RGD и его аналоги, которые широко исследуются для адресной доставки лекарств, нацеленных на глиому [11-13]. По структуре пептиды, содержащие последовательность RGD, могут быть линейными и циклическими (рис. 1).

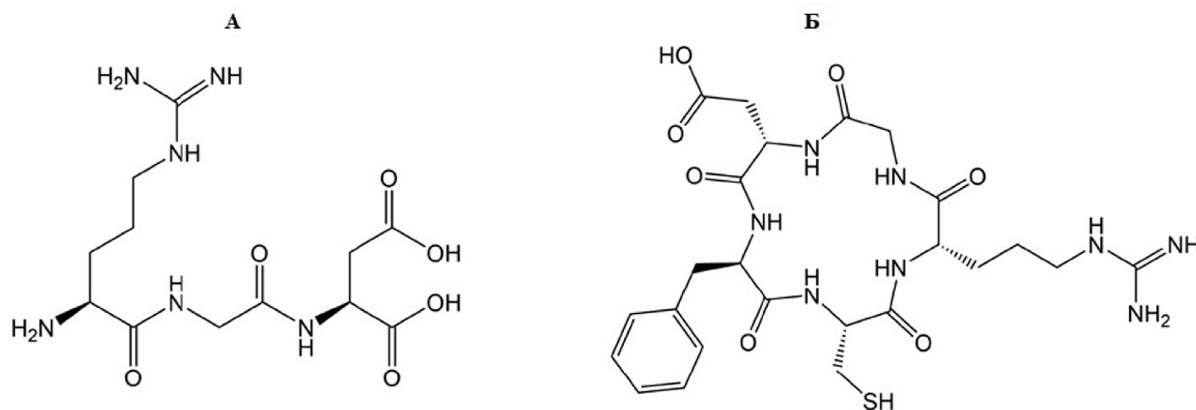


Рисунок 1. Структура линейного (А) и циклического (Б) RGD пептида, c(RGDfC).

Активность циклической структуры выше по сравнению с линейной [14]. Преимущество циклических пептидов RGD связано с конформационно менее гибкой структурой, которая может выдерживать протеолиз, кроме того, они обладают более высоким сродством к взаимодействию с интегриновыми рецепторами [14]. В ряде исследований было показано, что конъюгация липосом с RGD-пептидами имеет более высокий потенциал при лечении рака [14-16]. Липосомы представляют собой уникальную систему для доставки лекарств в клетки и, в частности, в отдельные клеточные компартменты, а липосомальные препараты демонстрируют высокий потенциал для использования в терапии рака [17].

Одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов, который используется отдельно или в комбинации в качестве терапии первой линии при многих видах рака является доксорубин (Dox). Он обладает высокой активностью, но в клетках глиомы есть эпигенетические механизмы, способствующие их выживанию. Одним из подходов для преодоления резистентности опухоли к Dox и уменьшения его побочных проявлений служит адресная доставка лекарств к опухоли [18-21]. Нами разработана фосфолипидная композиция Dox (NPh-Dox) и исследована её эффективность *in vivo* [22, 23]. Дополнительное включение в данную композицию адресного пептида Асн-Гли-Арг (NGR) способствовало накоплению Dox в опухолевых клетках, повышению экспрессирующих аминопептидазу N [24]. В связи с этим особый интерес представляло снабжение ранее разработанной фосфолипидной композиции Dox таргетным компонентом, специфичным к рецепторам на поверхности клеток глиомы — интегрина $\alpha_v\beta_3$.

Целью данной работы была оценка эффективности присоединения адресного cRGD пептида к ранее полученной фосфолипидной композиции Dox по накоплению Dox в клетках глиобластомы *in vitro*.

МЕТОДИКА

Получение и характеристика композиции

Для получения композиций был использован соевый фосфатидилхолин Lipoid S100 ("Lipoid", Германия). Доксорубин гидрохлорид был предоставлен компанией "Омутнинская научная опытно-промышленная база" (Россия). В качестве адресного пептида использовали cRGDfC ("Синтон-Лаб", Россия) с последующим присоединением линкера DSPE-Peg2000-Mal ("Avanti", США) для получения адресного конъюгата (DSPE-Peg2000-cRGD). Фосфолипидную композицию с адресным фрагментом (NPh-Dox-cRGD) получали плёночным методом [25], массовое соотношение основных компонентов Lipoid S100:DSPE-PEG2000-cRGD:Dox составляло 20:1:1. Размер и ζ -потенциал наночастиц (НЧ) полученной композиции определяли на анализаторе Zetasizer Nano ZS ("Malvern", Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZETASIZER 6.20. Процент встраивания Dox в НЧ оценивали методом ультрафильтрации

с использованием микрофильтров VivaSpin ("Sartorius AG", Германия). Концентрацию Dox определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1100 Series ("Agilent Technologies", США) [26].

Высвобождение Dox из НЧ in vitro

Оценку высвобождения Dox из НЧ с циклическим RGD пептидом с проводили с помощью диализа в диализных мешках (3,5 кДа). 1 мл NPh-Dox-cRGD (концентрация по Dox 0,25 мг/мл) в диализных мешках помещали в 10 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) (pH 5,0 и 7,4) ("ПанЭко", Россия) при 37°C при перемешивании на магнитной мешалке. Из каждого варианта проводили отбор аликвоты супернатанта (1 мл) через определённые промежутки времени (0,25 ч, 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 5 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч). После каждого отбора образца добавляли равное количество PBS. Высвобождение определяли с помощью спектрофотометра Agilent 8453 ("Agilent Technologies") при 254 нм.

Клеточные культуры

В эксперименте использовали клеточные линии глиобластомы человека U-87 MG, предоставленные лабораторией клеточной биологии ИБМХ. Клеточная линия HeLa получена в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва). Культивирование клеток осуществляли согласно рекомендациям, приведённым в сертификате клеточных культур. Использовали необходимые среды с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("ПанЭко", Россия) согласно стандартам АТСС. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере с относительной влажностью 95% с содержанием 5% CO₂ (CO₂-инкубатор "Binder", Германия). В данной работе применяли клеточные линии от 3 до 10 пассажей.

Оценка клеточного связывания и проникающей способности

Клеточные культуры U-87 MG и HeLa (10⁶ клеток на лунку) высевали в 6-луночные культуральные планшеты и проводили инкубацию на протяжении 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе ("Sanyo", Япония). В качестве композиции сравнения использовали фосфолипидную наноформу доксорубина (NPh-Dox). Образцы полученных композиций вносили с концентрацией 14 мкг/мл (в пересчёте на Dox) и инкубировали 3 ч при двух температурных режимах: 37°C в CO₂-инкубаторе и 4°C в холодильном оборудовании ("Атлант", Беларусь). Далее среду с композициями убирали, клетки промывали 2 раза PBS (pH 7,4). Dox экстрагировали раствором ацетонитрила ("Fisher Scientific", Великобритания) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты ("Sigma", США) в количестве 1 мл на лунку. Собранные экстракты разделяли методом центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин на настольной центрифуге Eppendorf 5810R ("Eppendorf", Германия). Концентрацию Dox в полученных образцах измеряли с помощью ВЭЖХ системы Agilent 1200 Series с колонкой Eclipse XDB-C18

(“Agilent Technologies”) и масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS (“Agilent Technologies”) [27]. Содержание Dox в клеточных культурах нормировали на уровень белка (мг), определяемого колориметрическим методом Лоури. Интернализацию вычисляли по разности содержания Dox при 37°C (общее накопление в клетках) и при 4°C (присоединение к клеточной поверхности [28]).

Статистическая обработка

Для оценки достоверности различий измеряемых параметров по трём повторностям использован критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. На рисунках данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами была показана перспективность использования пептидов в качестве адресных фрагментов для доставки лекарств в опухолевые клетки [24, 25]. Мишенью в данной работе был выбран интегрин $\alpha_v\beta_3$, который сверхэкспрессируется на клетках глиобластомы [29]. В качестве адресного вектора, обладающего специфичностью к интегринам $\alpha_v\beta_3$, был использован циклический RGD (cRGD) пептид, обладающий большей энергией связывания с белком-мишенью [30] и более устойчивый в физиологических условиях [14] по сравнению с его линейной формой (рис. 1).

Композиция NPh-Dox-cRGD, полученная путём присоединения к фосфолипидным НЧ пептидного конъюгата, представляла собой ультрамелкую эмульсию с размером частиц $43,76 \pm 2,09$ нм (рис. 2А).

При добавлении к фосфолипидной композиции Dox (NPh-Dox) [24] адресного пептида наблюдалось увеличение размера частиц в допустимых для прохождения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) значениях [31], который не превышал 100 нм. Данное свойство — влияние размера частиц на их распределение в опухоли и прохождение через ГЭБ — было подтверждено в работе [32]:

с помощью ^{64}Cu -меченых частиц разного размера, МРТ и позитронно-эмиссионной томографии на внутричерепной модели GBM крысы было продемонстрировано значительно большее поглощение 20-нм НЧ, чем 110-нм. Данные результаты позволяют предположить перспективность полученной нами композиции NPh-Dox-cRGD для прохождения через ГЭБ и возможность повышенного накопления лекарства в глиобластоме.

Показатель ζ -потенциала характеризует устойчивость коллоидной системы: чем выше значение данного показателя, тем устойчивее система. При этом заряд композиции оказывает существенное влияние на взаимодействие компонентов и композиции в целом в условиях *in vivo*. Для исследуемой композиции NPh-Dox-cRGD показатель ζ -потенциала составлял $4,33 \pm 0,54$ мВ (рис. 2Б), то есть система не является стабильной. Для сохранения свойств препарата целесообразно его лиофильное высушивание. Положительный заряд в данном случае может оказать значительное влияние на трансклеточный транспорт наночастиц и их взаимодействие с отрицательно заряженным поверхностным гликокаликсом и базальной мембраной ГЭБ. Так, в работе [33] *in vitro* для частиц менее 100 нм было показано, что электростатическая сила между отрицательным зарядом на поверхности клеток ГЭБ и положительным зарядом на НЧ значительно увеличивает степень проникновения НЧ.

Показателем эффективности инкапсуляции лекарства в НЧ является процент его включения в частицы. Оценку проводили методом ультрацентрифугирования и ВЭЖХ, по результатам которой было показано, что Dox практически полностью был встроен в НЧ. Процент включения составлял $99,7 \pm 0,58\%$.

Одной из важных характеристик лекарств является их высвобождение из НЧ. Моделирование различных условий позволяет понять и предположить действие композиции и её активных компонентов в условиях *in vivo*. Согласно литературным данным, естественный градиент pH в эндосомах или лизосомах опухолевых клеток составляет 5,0-6,5, а в микроокружении опухоли — 6,5-7,2 [34].

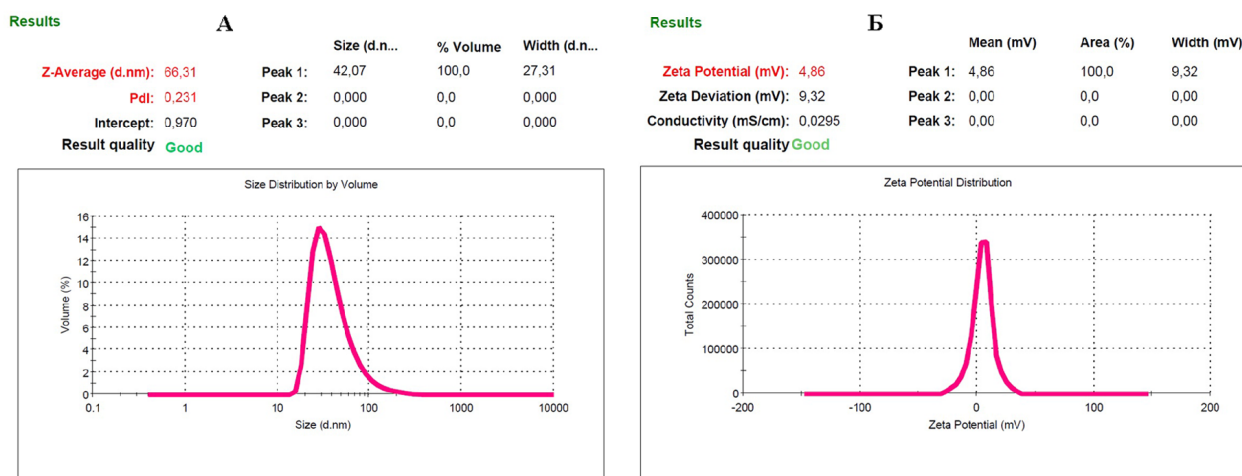


Рисунок 2. Размер частиц (А); ζ -потенциал (Б) водного раствора композиции NPh-Dox-cRGD.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО НАКОПЛЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА

Таким образом, исследование высвобождения Dox из фосфолипидных НЧ позволит понять зависимость данного свойства от условий среды. Оценка высвобождения показала повышение уровня высвобождения в условиях понижения pH до 5,0, содержание Dox при таком значении составило $35 \pm 3,2\%$ (рис. 3). При этом через 48 ч инкубации в PBS при pH 7,4 высвобождение лекарства соответствовало максимальному уровню $24 \pm 1,4\%$. В дальнейшем уровень высвобождения практически не изменялся в течение 72 ч.

При этом через 48 ч инкубации в PBS при pH 7,4 высвобождение лекарства соответствовало максимальному уровню $24 \pm 1,4\%$. В дальнейшем уровень высвобождения практически не изменялся в течение 72 ч.

Для оценки клеточного накопления и интернализации полученной композиции (NPh-Dox-cRGD) была выбрана клеточная линия U-87 MG, экспрессирующая, согласно литературным данным [35], интегрин $\alpha_v\beta_3$. В качестве препаратов сравнения использовали субстанцию доксорубина (Dox) и фосфолипидную композицию (NPh-Dox). Клеточную линию HeLa, не экспрессирующую на своей поверхности интегрин $\alpha_v\beta_3$, выбрали в качестве контрольной линии. После инкубации клеток U-87 MG с исследуемыми веществами в течение 3 ч было показано, что при включении адресного пептида

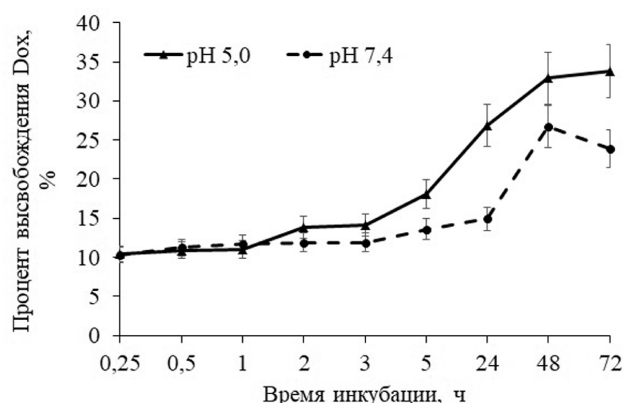
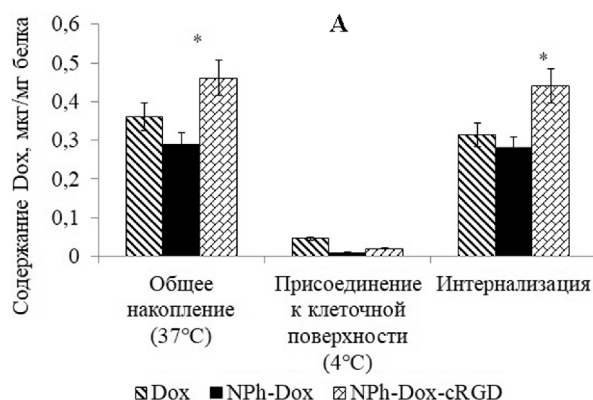


Рисунок 3. Высвобождение Dox из наночастиц методом диализа при инкубации NPh-Dox-cRGD в растворах с различным pH (5,0 и 7,4).



происходило увеличение как общего накопления Dox, так и его интернализации (рис. 4А).

По сравнению со свободной субстанцией общее накопление Dox для NPh-Dox-cRGD было выше в ~1,3 раза, а интернализация в ~1,4 раза, что свидетельствует о возможном связывании адресного пептида с белком-мишенью. Различия наблюдались и в сравнении с фосфолипидной композицией. Однако эффекта по накоплению и проникновению Dox, встроенного в фосфолипидные НЧ, по сравнению со свободным препаратом не наблюдается.

Адресный пептид в варианте с интегрин-экспрессирующими клетками глиобластомы U-87 MG проявлял свои свойства и способствовал большему накоплению и интернализации лекарства внутри клетки (рис. 4). На клетках HeLa, которые интегрин $\alpha_v\beta_3$ не экспрессируют, данный эффект отсутствовал, и проникающая способность Dox была ниже (рис. 4Б). Можно предположить, что в случае интегрин-негативных клеток пептид на поверхности НЧ “связывал” Dox, создавая барьер для выхода из НЧ, и не давал лекарству проникнуть в клетку. В варианте интегрин-положительных клеток, скорее всего, на первом этапе происходит связывание адресного лиганда со своим рецептором; при этом “открывается” часть поверхности наночастицы, необходимой для слияния с мембраной клетки, и уже после этого Dox интернализуется внутри клетки. В вариантах композиции без пептидов показана примерно одинаковая степень проникающей способности лекарства, то есть в данном случае интегрин-зависимый эффект отсутствовал. Для проверки корректности данного предположения требуется проведение дополнительных экспериментов по изучению как самой структуры единичной молекулы в полученной композиции, так и взаимодействия с мембраной опухолевых клеток с использованием высокоточных методов.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования адресного пептида cRGD для доставки Dox в клетки глиобластомы. Для понимания эффективности полученной композиции в условиях живого организма необходимо проведение дальнейших исследований, как *in vitro*, так и *in vivo*, которые позволят судить об её эффективности и безопасности.

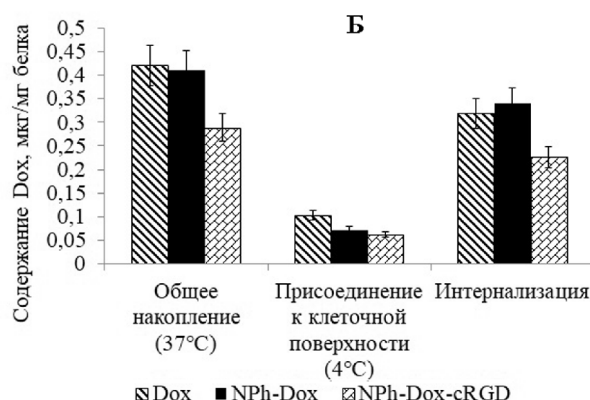


Рисунок 4. Накопление Dox в культуре клеток U-87 MG (А) и HeLa (Б) через 3 ч инкубации с исследуемыми композициями и субстанцией Dox.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проявления побочных эффектов при использовании лекарственных средств являются следствием их неспецифического воздействия на клетки здоровых органов и тканей. Возможность снижения токсического проявления, нацеливание на ткань-мишень, а также преодоление ГЭБ является очень важной проблемой при терапии глиобластомы. Для снижения возможных рисков и увеличения продолжительности жизни пациентов ведутся работы по снабжению лекарств адресными системами доставки. Перспективным адресным агентом является cRGD, нацеленный на интегрин $\alpha_v\beta_3$, сверхэкспрессирующийся на поверхности клеток глиобластомы [29, 35]. В данной работе получена композиция NPh-Dox-cRGD, представляющая ультратонкую эмульсию с размером менее 50 нм, которая благодаря своим малым размерам, сможет преодолевать ГЭБ. В кислой среде (pH 5,0, имитирующая pH кислых внутриклеточных компартментов, таких как эндосомы) высвобождение Dox происходит в большей степени по сравнению с физиологическим pH (7,4) и достигает максимального значения (35%) через 24 ч.

Использование циклического RGD пептида позволяет повысить накопление Dox внутри клетки (интернализацию) и общее его накопление на клеточной линии глиобластомы человека U-87 MG, экспрессирующей интегрин $\alpha_v\beta_3$. Возможно, данный эффект позволит улучшить дальнейшее лечение глиобластом и снизить побочные проявления на здоровые ткани за счёт использования адресного фрагмента, селективного к ткани-мишени.

Таким образом, полученная композиция Dox, встроенного в фосфолипидные НЧ с адресным cRGD является перспективной в терапии глиобластомы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории клеточной биологии ИБМХ Я.С. Киму и к.б.н. А.М. Гисиной за предоставление клеточного материала для экспериментов *in vitro*, а также сотруднику лаборатории биосинтеза белка к.б.н. Г.Е. Морозевич за помощь в проведении экспериментов *in vitro*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122030100170-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Luo C., Song K., Wu S., Hameed N.F., Kudulaiti N., Xu H., Qin Z.Y., Wu J.S. (2021) The prognosis of glioblastoma: A large, multifactorial study. *Br. J. Neurosurg.*, **35**(5), 555-561. DOI: 10.1080/02688697.2021.1907306
2. Zhang C., Song J., Lou L., Qi X., Zhao L., Fan B., Sun G., Lv Z., Fan Z., Jiao B., Yang J. (2021) Doxorubicin-loaded nanoparticle coated with endothelial cells-derived exosomes for immunogenic chemotherapy of glioblastoma. *Bioeng. Transl. Med.*, **6**(3), e10203. DOI: 10.1002/btm2.10203
3. Touat M., Idhahbi A., Sanson M., Ligon K.L. (2017) Glioblastoma targeted therapy: Updated approaches from recent biological insights. *Annals Oncology*, **28**(7), 1457-1472. DOI: 10.1093/annonc/mdx106
4. Cheng T.M., Chang W.J., Chu H.Y., de Luca R., Pedersen J.Z., Incerpi S., Li Z., Shih Y., Lin H., Wang K., Whang-Peng J. (2021) Nano-strategies targeting the integrin $\alpha_v\beta_3$ network for cancer therapy. *Cells*, **10**(7), 1684. DOI: 10.3390/cells10071684
5. Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. (2010) Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, **10**(1), 9-22. DOI: 10.1038/nrc2748
6. Hood J.D., Cheresh D.A. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 958-959. DOI: 10.1038/nrc727
7. Bello L., Francolini M., Marthyn P., Zhang J., Carroll R.S., Nikas D.C., Strasser J.F., Villani R., Cheresh D.A., Black P.M. (2001) Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery-Hagerstown*, **49**(2), 380-390. DOI: 10.1097/00006123-200108000-00022
8. Echavidre W., Picco V., Faraggi M., Montemagno C. (2022) Integrin- $\alpha_v\beta_3$ as a therapeutic target in glioblastoma: Back to the future? *Pharmaceutics*, **14**(5), 1053. DOI: 10.3390/pharmaceutics14051053
9. Wei X., Chen X., Ying M., Lu W. (2014) Brain tumor-targeted drug delivery strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **4**(3), 193-201. DOI: 10.1016/j.apsb.2014.03.001
10. Liolios C., Sachpekidis C., Kolocouris A., Dimitrakopoulou-Strauss A., Bouziotis P. (2021) PET diagnostic molecules utilizing multimeric cyclic RGD peptide analogs for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ receptors. *Molecules*, **26**(6), 1792. DOI: 10.3390/molecules26061792
11. Gečys D., Kazlauskas A., Gečytė E., Paužienė N., Kulakauskienė D., Lukminaitė I., Jekabsone A. (2022) Internalisation of RGD-engineered extracellular vesicles by glioblastoma cells. *Biology*, **11**(10), 1483. DOI: 10.3390/biology11101483
12. Zhan C., Meng Q., Li Q., Feng L., Zhu J., Lu W. (2012) Cyclic RGD-polyethylene glycol-polyethylenimine for intracranial glioblastoma-targeted gene delivery. *Chemistry – An Asian Journal*, **7**(1), 91-96. DOI: 10.1002/asia.201100570
13. Garanti T., Alhnan M.A., Wan K.W. (2020) RGD-decorated solid lipid nanoparticles enhance tumor targeting, penetration and anticancer effect of asiatic acid. *Nanomedicine*, **15**(16), 1567-1583. DOI: 10.2217/nnm-2020-0035
14. Wang F., Li Y., Shen Y., Wang A., Wang S., Xie T. (2013) The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(7), 13447-13462. DOI: 10.3390/ijms140713447
15. Liu C., Zhao W., Zhang L., Sun H., Chen X., Deng N. (2022) Preparation of DSPE-PEG-cRGD modified cationic liposomes for delivery of OC-2 shRNA and the antitumor effects on breast cancer. *Pharmaceutics*, **14**(10), 2157. DOI: 10.3390/pharmaceutics14102157

16. Li L., He D., Guo Q., Zhang Z., Ru D., Wang L., Gong K., Liu F., Duan Y., Li H. (2022) Exosome-liposome hybrid nanoparticle codelivery of TP and miR497 conspicuously overcomes chemoresistant ovarian cancer. *J. Nanobiotechnology*, **20**(1), 1-22. DOI: 10.1186/s12951-022-01264-5
17. Torchilin V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug Discov.*, **4**(2), 145-160. DOI: 10.1038/nrd1632
18. Zhang Y., Xi K., Fu X., Sun H., Wang H., Yu D., Li Z., Ma Y., Liu X., Huang B., Wang J., Li G., Cui J., Li X., Ni S. (2021) Versatile metal-phenolic network nanoparticles for multitargeted combination therapy and magnetic resonance tracing in glioblastoma. *Biomaterials*, **278**, 121163. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121163
19. Kasenda B., König D., Manni M., Ritschard R., Duthaler U., Bartoszek E., Bärenwaldt A., Deuster S., Hutter G., Cordier D., Mariani L., Hench J., Frank S., Krähenbühl S., Zippelius A., Rochlitz C., Mamot C., Wicki A., Läubli H. (2022) Targeting immunoliposomes to EGFR-positive glioblastoma. *ESMO Open*, **7**(1), 100365. DOI: 10.1016/j.esmoop.2021.100365
20. Chen J., Dai Q., Yang Q., Bao X., Zhou Y., Zhong H., Wu L., Wang T., Zhang Z., Lu Y., Zhang Z., Lin M., Han M., Wei Q. (2022) Therapeutic nucleus-access BNCT drug combined CD47-targeting gene editing in glioblastoma. *J. Nanobiotechnology*, **20**(1), 1-18. DOI: 10.1186/s12951-022-01304-0
21. He C., Zhang Z., Ding Y., Xue K., Wang X., Yang R., An Y., Liu D., Hu C., Tang Q. (2021) LRP1-mediated pH-sensitive polymersomes facilitate combination therapy of glioblastoma *in vitro* and *in vivo*. *J. Nanobiotechnology*, **19**(1), 1-17. DOI: 10.1186/s12951-020-00751-x
22. Медведева Н.В., Торховская Т.И., Кострюкова Л.В., Захарова Т.С., Кудинов В.А., Касаткина Е.О., Прохоровский В.Н., Ипатова О.М. (2017) Влияние включения доксорубина в фосфолипидные наночастицы на накопление в опухоли и специфическую активность. *Биомедицинская химия*, **63**(1), 56-61. [Medvedeva N.V., Torkhovskaya T.I., Kostryukova L.V., Zakharova T.S., Kudinov V.A., Kasatkina E.O., Prozorovskiy V.N., Ipatova O.M. (2017) Influence of doxorubicin inclusion into phospholipid nanoparticles on tumor accumulation and specific activity. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **63**(1), 56-61.] DOI: 10.18097/PBMC2017630156
23. Немцова Е.Р., Тихонова Е.Г., Безбородова О.А., Панкратов А.А., Венедиктова Ю.Б., Короткевич Е.И., Кострюкова Л.В., Терешкина Ю.А. (2020) Доклиническое изучение фармакологических свойств препарата "Доксорубин-НФ". *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **169**(6), 720-726. [Nemtsova E.R., Tikhonova E.G., Bezborodova O.A., Pankratov A.A., Venediktova J.B., Korotkevich E.I., Kostryukova L.V., Tereshkina J.A. (2020) Preclinical study of pharmacological properties of doxorubicin-NPh. *Bull. Exper. Biol. Med.*, **169**(6), 778-782.] DOI: 10.1007/s10517-020-04977-5
24. Кострюкова Л.В., Терешкина Ю.А., Короткевич Е.И., Прохоровский В.Н., Торховская Т.И., Морозевич Г.Е., Торопыгин И.Ю., Константинов М.А., Тихонова Е.Г. (2020) Система адресной доставки для доксорубина на основе специфического пептида и фосфолипидных наночастиц. *Биомедицинская химия*, **66**(6), 464-468. [Kostryukova L.V., Tereshkina Y.A., Korotkevich E.I., Prozorovsky V.N., Torkhovskaya T.I., Morozovich G.E., Toropygin I.Y., Konstantinov M.A., Tikhonova E.G. (2020) Targeted drug delivery system for doxorubicin based on a specific peptide and phospholipid nanoparticles. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(6), 464-468.] DOI: 10.18097/PBMC20206606464
25. Prozorovskiy V.N., Kostryukova L.V., Korotkevich E.I., Torkhovskaya T.I., Morozovich G.E., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. (2018) Photosensitizer chlorin e6 internalization into tumor cells in phospholipid nanoparticles conjugated with peptide containing the NGR sequence. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **1**(4), e00063. DOI: 10.18097/BMCRM00063
26. Tikhonova E.G., Sanzhakov M.A., Tereshkina Y.A., Kostryukova L.V., Khudoklinova Y.Y., Orlova N.A., Bobrova D.V., Ipatova O.M. (2022) Drug transport system based on phospholipid nanoparticles: Production technology and characteristics. *Pharmaceutics*, **14**(11), 2522. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112522
27. Зыкова М.А., Ипатова О.М., Прохоровский В.Н., Медведева Н.В., Воскресенская А.А., Захарова Т.С., Торховская Т.И. (2011) Изменение распределения доксорубина в крови и плазме при его включении в состав фосфолипидной наноконструкции. *Биомедицинская химия*, **57**(2), 174-179. [Zykova M.A., Ipatova O.M., Prozorovskiy V.N., Medvedeva N.V., Voskresenskaya A.A., Zakharova T.S., Torkhovskaya T.I. (2011) Changes in the distribution of doxorubicin in blood and plasma when it is included in the phospholipid nanocomposition. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **57**(2), 174-179.] DOI: 10.18097/pbmc20115702174
28. Sheldon K., Liu D., Ferguson J., Gariepy J. (1995) Lolligomers: Design of *de novo* peptide-based intracellular vehicles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**(6), 2056-2060. DOI: 10.1073/pnas.92.6.2056
29. He S., Cen B., Liao L., Wang Z., Qin Y., Wu Z., Liao W., Zhang Z., Ji A. (2017) A tumor-targeting cRGD-EGFR siRNA conjugate and its anti-tumor effect on glioblastoma *in vitro* and *in vivo*. *Drug Delivery*, **24**(1), 471-481. DOI: 10.1080/10717544.2016.1267821
30. Li N., Qiu S., Fang Y., Wu J., Li Q. (2021) Comparison of linear vs. cyclic RGD pentapeptide interactions with integrin $\alpha v \beta 3$ by molecular dynamics simulations. *Biology*, **10**(7), 688. DOI: 10.3390/biology10070688
31. Xinming L., Tsibouklis J., Weng T., Zhang B., Yin G., Feng G., Cui Y., Savina I., Mikhailovska L., Sandeman S., Howell C., Mikhailovsky S. (2016) Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier. *J. Drug Targeting*, **25**(1), 17-28. DOI: 10.1080/1061186X.2016.1184272
32. Seo J.W., Ang J., Mahakian L.M., Tam S., Fite B., Ingham E.S., Beyer J., Forsayeth J., Bankiewicz K.S., Xu T., Ferrara K.W. (2015) Self-assembled 20-nm ^{64}Cu -micelles enhance accumulation in rat glioblastoma. *J. Controlled Release*, **220**, 51-60. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.057
33. Zhang L., Fan J., Li G., Yin Z., Fu B.M. (2020) Transcellular model for neutral and charged nanoparticles across an *in vitro* blood-brain barrier. *Cardiovasc. Eng. Technol.*, **11**(6), 607-620. DOI: 10.1007/s13239-020-00496-6
34. Meng F., Zhong Y., Cheng R., Deng C., Zhong Z. (2014) pH-sensitive polymeric nanoparticles for tumor-targeting doxorubicin delivery: Concept and recent advances. *Nanomedicine*, **9**(3), 487-499. DOI: 10.2217/nm.13.212
35. Lanzardo S., Conti L., Brioschi C., Bartolomeo M.P., Arosio D., Belvisi L., Manzoni L., Maiocchi A., Maisano F., Forni G. (2011) A new optical imaging probe targeting $\alpha v \beta 3$ integrin in glioblastoma xenografts. *Contrast Media Molecular Imaging*, **6**(6), 449-458. DOI: 10.1002/cmmi.444

Поступила в редакцию: 11. 11. 2022.
После доработки: 07. 12. 2022.
Принята к печати: 13. 12. 2022.

**STUDY OF THE EFFICIENCY OF CELLULAR ACCUMULATION OF DOXORUBICIN
SUPPLIED WITH A TARGETED DELIVERY SYSTEM BASED ON PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES
WITH INTEGRIN-DIRECTED PEPTIDE**

*L.V. Kostryukova, Yu.A. Tereshkina, E.G. Tikhonova, M.A. Sanzhakov, D.V. Bobrova, Yu.Yu. Khudoklinova**

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119221 Russia; *e-mail: hudoklinova@mail.com

Chemotherapeutic agents containing targeted systems are a promising pathway to increase the effectiveness of glioblastoma treatment. Specific proteins characterized by increased expression on the surface of tumor cells are considered as possible targets. Integrin $\alpha_v\beta_3$ is one of such proteins on the cell surface. It effectively binds the cyclic Arg-Gly-Asp (cRGD) peptide. In this study, the cRGD peptide-modified doxorubicin (Dox) phospholipid composition was investigated. The particle size of this composition was 43.76 ± 2.09 nm, the ζ -potential was 4.33 ± 0.54 mV. Dox was almost completely incorporated into the nanoparticles ($99.7 \pm 0.58\%$). The drug release increased in an acidic medium (at pH 5.0 of about $35 \pm 3.2\%$). The total accumulation and internalization of Dox used the composition of phospholipid nanoparticles with the targeted vector was 1.4-fold higher as compared to the free form. In the HeLa cell line (not expressing $\alpha_v\beta_3$ integrin) this effect was not observed. These results suggest the prospects of using the cyclic RGD peptide in the delivery of Dox to glioblastoma cells and the feasibility of further investigation of the mechanism of action of the entire composition as a whole.

Key words: glioblastoma; phospholipid nanoparticles; cRGD; $\alpha_v\beta_3$ integrin; chemotherapy; doxorubicin

Funding. The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (No. 122030100170-5).

Received: 11.11.2022; revised: 07.12.2022; accepted: 13.12.2022.