

©Коллектив авторов

ДВУХВЕКТОРНАЯ ТРАНСПОРТНАЯ ФОСФОЛИПИДНАЯ НАНОСИСТЕМА ДОКСОРУБИЦИНА: НАКОПЛЕНИЕ В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *IN VITRO*

Ю.А. Терешкина, Ф.Н. Бедретдинов, Л.В. Кострюкова*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: kostryukova87@gmail.com

Для лечения рака молочной железы используют различные химиотерапевтические агенты, в том числе антрациклиновый антибиотик доксорубин, обладающий наряду с цитостатическим действием серьёзными побочными эффектами. Для снижения его негативного влияния на здоровые органы и ткани, повышения его накопления в опухоли доксорубин был встроен в фосфолипидные наночастицы. Дополнительное использование векторных молекул для направленной доставки к конкретным мишеням может повысить эффективность препарата за счёт более высокого накопления активного вещества в опухолевой ткани. В качестве мишеней таких векторных молекул в данной работе были рассмотрены интегрин $\alpha_v\beta_3$, играющий важную роль в ангиогенезе рака, и рецептор фолиевой кислоты, отвечающий за клеточную дифференцировку и пролиферацию. Была получена фосфолипидная композиция доксорубина с двумя векторными лигандами — cRGD-пептидом и фолиевой кислотой (NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)). Исследование физических свойств разработанной композиции NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4) показало, что средний размер частиц составлял $39,62 \pm 4,61$ нм, значение ζ -потенциала — $4,17 \pm 0,83$ мВ; при этом практически весь доксорубин был встроен в фосфолипидные наночастицы ($99,85 \pm 0,21\%$). Одновременное использование двух векторов в композиции приводило к увеличению значения накопления доксорубина в клетках рака молочной железы MDA-MB-231 практически на 20% по сравнению с композициями, содержащими каждый вектор отдельно (фолиевую кислоту и cRGD-пептид). При этом степень интернализации доксорубина была на 22% и 24% выше, чем при использовании только фолиевой кислоты и cRGD-пептида соответственно. Цитотоксическое действие на клетки MDA-MB-231 было выше при инкубации с композициями, содержащими фолиевую кислоту в качестве одного вектора (NPh-Dox-Fol(3,4)) и совместно с пептидным (NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)). На диплоидной клеточной линии фибробластов Wi-38 была отмечена значительно меньшая степень цитотоксического действия фосфолипидной композиции, независимо от наличия в ней векторных молекул, по сравнению с субстанцией доксорубина. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования двух векторов в одной фосфолипидной композиции для направленной доставки доксорубина.

Ключевые слова: рак молочной железы; фосфолипидные наночастицы; cRGD; интегрин $\alpha_v\beta_3$; химиотерапия; доксорубин; фолиевый рецептор

DOI: 10.18097/PBMC20236906409

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространённым онкологическим заболеванием у женщин. В России в 2021 году абсолютное число случаев РМЖ составило 12,1% в структуре общей заболеваемости раком [1]. У женщин заболеваемость РМЖ составляет 22,1% от общего числа всех онкологических патологий и занимает первое место. РМЖ является генетическим заболеванием, состоит из различных подтипов, с отчётливыми молекулярными характеристиками и генетическим профилем: нормальный, люминальный А, люминальный В, обогащённый рецептором 2 эпидермального фактора роста человека (HER2) и базальноподобный [2, 3]. Для лечения РМЖ совместно с хирургическим вмешательством и лучевой терапией применяют химиотерапевтическое лечение. Одним из широкоиспользуемых препаратов для химиотерапии является доксорубин (Dox). Однако его клиническое применение всё ещё ограничено из-за кардиотоксического действия и множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) [4, 5]. В последние несколько десятилетий терапия рака претерпела изменения благодаря развитию нанотехнологий,

создающих наночастицы (НЧ) с различными формами, размерами, поверхностными свойствами и контролируемым тем или иным способом поведением *in vitro* / *in vivo* [6]. Использование НЧ в качестве наномосителей способствует улучшению качества (оптимизации) лекарств, в частности, повышает биодоступность за счёт пассивного нацеливания на мембранные структуры, усиления проницаемости и времени удержания, либо активного нацеливания на основании взаимодействия лиганд-рецептор [7, 8]. В исследованиях используют частицы субмикронного размера (3–200 нм), получаемые с использованием различных материалов, включая липиды (липосомы), полимеры (полимерные НЧ, мицеллы или дендримеры), вирусы (вирусные НЧ) и даже металлоорганические соединения (нанотрубки) [9, 10].

Большое внимание привлекают липосомы, благодаря своей высокой биосовместимости, низкой токсичности, высокой инклюзивности (всеохватности) и улучшенной биодоступности встроённых в них лекарств [11]. Они обладают некоторой способностью пассивного нацеливания, но сам по себе эффект пассивного нацеливания очень ограничен, в то время как активное нацеливание является

эффективной стратегией для улучшения накопления лекарства в ткани-мишени. Активное нацеливание липосом-носителей лекарств является объектом изучения на протяжении нескольких последних десятилетий [12]. Липосомы можно модифицировать, конъюгируя со специфическими лигандами, способными избирательно взаимодействовать с рецепторами, сверхэкспрессирующимися на поверхности опухолевых клеток. Такие модификации повышают накопление лекарства внутри опухоли и усиливают его терапевтический эффект [13].

Решающую роль в минимизации заболеваемости РМЖ и связанной с ним смертности может сыграть характеристика свойств опухоли и изучение задействованных в её ангиогенезе биологических процессов. Так, в ангиогенезе РМЖ большое значение имеет интегрин $\alpha_v\beta_3$, экспрессируемый на эндотелиальных и некоторых других опухолевых клетках. Трипептид с последовательностью аргинин-глицин-аспартат (Arg-Gly-Asp, RGD) предпочтительно связывается с интегрином $\alpha_v\beta_3$, обладающим высокой экспрессией в новой эндотелиальной системе сосудов, а также способным индуцировать апоптоз и гибель опухолевого сосуда [14]. В этом контексте нацеливание на опухолевые сосуды или опухолевые клетки с помощью зондов на основе RGD-пептида является многообещающей стратегией терапии РМЖ. Ожидается, что модификация Дох-содержащих наночастиц RGD-лигандом улучшит транспорт лекарства в опухолевые клетки [15].

Для направленной доставки лекарств используют также малые молекулы, например, фолиевую кислоту (FA). Этот водорастворимый витамин группы В, содержащийся в зелёных листовых культурах, овощах и других растениях и участвующий в синтезе ДНК или делении клеток, важный элемент для всех клеток. FA транспортируется в здоровые или раковые клетки при участии рецепторов фолиевой кислоты на клеточной поверхности. При этом экспрессия фолатных рецепторов в раковых клетках выше, чем в нормальных [16]. В контексте доставки Дох в опухолевые клетки РМЖ использование FA совместно с оксидом графена было эффективно и безопасно *in vitro* и *in vivo* [17]. Применение FA в качестве самостоятельного адресного фрагмента для доставки Дох клеткам РМЖ также было эффективно *in vitro* и *in vivo* [18–20].

Учитывая вышеизложенное, ранее разработанную в Институте биомедицинской химии (ИБМХ) фосфолипидную композицию Дох [21–24] модифицировали двумя векторными молекулами — FA и циклического пептида RGD — с целью

адресной/направленной доставки Дох. Были получены несколько вариантов фосфолипидных композиций Дох с адресными лигандами (FA и cRGD) и проведена оценка накопления Дох в опухолевых клетках и цитотоксического действия *in vitro*.

МЕТОДИКА

Получение композиций Дох, встроенного в фосфолипидные НЧ с адресными лигандами FA и cRGD

Композиции были получены с использованием соевого фосфатидилхолина Lipoid S100 (“Lipoid”, Германия). Доксорубин гидрохлорид был предоставлен Омутнинской научной опытно-промышленной базой (Россия). Конъюгат DSPE-Peg2000-cRGD получали согласно методике, описанной в работе [25], используя адресный циклический пептид cRGDfC (“Синтон-Лаб”, Россия) и линкер DSPE-Peg2000-Maleimid (“Nanosoft Polymers”, США). Молярное соотношение DSPE-Peg2000-Maleimid:cRGDfC составляло 1:2. Исходные реагенты растворяли в PBS (0,01 M) (“ПанЭко”, Россия) + ЭДТА (2 mM) (“Sigma-Aldrich”, США) + ТЭА (триэтиламин, 2 mM) (“Fluka”, Бельгия) (pH 7,4). Инкубационную смесь барботировали аргоном, инкубировали при комнатной температуре и перемешивании в течение 24 ч. Далее проводили диализ (3,5 кДа) против воды в течение 48 ч для удаления непрореагировавших веществ, затем проводили лиофильное высушивание. В качестве второго вектора использовали конъюгат фолиевой кислоты DSPE-Peg3400-Folate (“Nanosoft Polymers”). Для приготовления композиций Дох, использовали соотношения компонентов, указанные в таблице 1.

Композицию с адресными фрагментами получали “плёночным методом” аналогично методике [26]. Навески Lipoid S100, DSPE-Peg2000-cRGD и DSPE-Peg3400-Folate растворяли в небольшом количестве (2–3 мл) этилового спирта (“Медхимпром”, Россия). Полученные спиртовые растворы смешивали, после чего спирт упаривали на ротационном испарителе Heidolph Laborota 4003 (“Heidolph”, Германия) в течение 8–10 мин при следующих условиях: 60 мбар, температура воды в бане 30°C, скорость вращения ротора 1190 об/мин. Полученную липидную плёнку регидратировали дистиллированной водой с добавлением Дох. Грубую эмульсию обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе Bandelin Sonopuls (“Bandelin”, Германия) с использованием титанового стержня KE72 в течение 6 мин при мощности 50%. Образцы сравнения готовили аналогично.

Таблица 1. Соотношение основных компонентов для приготовления фосфолипидных композиций Дох (w/w)

Компоненты Композиции	Lipoid S100	Дох	DSPE-Peg2000-cRGD	DSPE-Peg3400-Folate
NPh-Дох	20	1	—	—
NPh-Дох-cRGD	20	1	1	—
NPh-Дох-Fol(3,4)	20	1	—	1
NPh-Дох-cRGD-Fol(3,4)	20	1	1	1

В полученных Dox-содержащих композициях определяли размер частиц и ζ -потенциал 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 500 (“Sartorius AG”, Германия). Концентрацию Dox определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1100 Series (“Agilent Technologies”, США) [27].

Оценка стабильности композиций Dox

Стабильность полученных композиций исследовали в дистиллированной воде, PBS (pH 7,4) и среде DMEM (“ПанЭко”), разводя 10-кратно соответствующим раствором. Стабильность оценивали по изменению размера частиц в растворе через определённые интервалы времени (0 ч; 0,25 ч; 0,5 ч; 1 ч; 3 ч; 24 ч и 48 ч). Размер частиц измеряли на анализаторе Zetasizer Nano ZS. Изменение процента включения Dox в НЧ контролировали через 1 ч и 24 ч, используя микрофильтры VivaSpin 500 и хроматографическую систему Agilent 1100 Series.

Клеточные культуры

В эксперименте использовали клеточные линии трижды негативного РМЖ MDA-MB-231, рака шейки матки HeLa и диплоидную клеточную линию фибробластов человека Wi-38. Все клеточные линии, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), поддерживались в коллекции клеточных культур ИБМХ. Культивирование клеток MDA-MB-231, HeLa и Wi-38 осуществляли согласно рекомендациям в сертификате клеточных культур ATCC. Для этого использовали необходимые среды с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови (“ПанЭко”). Клетки MDA-MB-231, HeLa и Wi-38 культивировали при 37°C в атмосфере с относительной влажностью 95% с содержанием 5% CO₂ (CO₂-инкубатор “Sanyo”, Япония). В данной работе применяли клеточные линии от 3 до 10 пассажей.

Оценка клеточного связывания и проникающей способности

Клеточные культуры MDA-MB-231, HeLa и Wi-38 (10⁶ клеток на лунку) высевали в 6-луночные культуральные планшеты (“Biologix”, Китай) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. В качестве сравнения (контроль) использовали свободную субстанцию Dox. Образцы полученных композиций и свободную субстанцию вносили с концентрацией 14 мкг/мл (в пересчёте на Dox) и инкубировали в течение 3 ч при двух температурных режимах: 37°C в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония) и 4°C в холодильном оборудовании (“АТЛАНТ”, Беларусь). Далее среду с композициями убирали, клетки промывали 2 раза PBS. Экстракцию Dox выполняли раствором ацетонитрила (“Fisher Scientific”, Великобритания) с добавлением 0,1% муравьиной

кислоты (“Sigma”, США) — 1 мл на лунку. Собранные экстракты разделяли центрифугированием 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”) с масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS (“Agilent Technologies”) [24]. Содержание Dox в клеточных культурах нормировали на содержание белка (мг), который определяли 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].

Цитотоксическое действие in vitro

Оценку цитотоксического действия разработанной фосфолипидной композиции Dox с двумя адресными молекулами RGD и FA (NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)) проводили на линии клеток трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231, рака шейки матки HeLa и диплоидной клеточной линии фибробластов человека Wi-38. В качестве препаратов сравнения исследовали свободную субстанцию Dox, встроенную в фосфолипидные НЧ (NPh-Dox), встроенную в фосфолипидные НЧ с адресным cRGD-пептидом (NPh-Dox-cRGD) и встроенную в фосфолипидные НЧ с фолатным конъюгатом (NPh-Dox-Fol(3,4)).

Клетки MDA-MB-231, HeLa и Wi-38 (7,5×10³ клеток на лунку) рассеивали в стерильные 96-луночные культуральные планшеты и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24–26 ч. После вносили исследуемые вещества/композиции с концентрациями по Dox: 0,025 мкг/мл; 0,05 мкг/мл; 0,5 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 5 мкг/мл; 7,5 мкг/мл и 15 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 24 ч и 48 ч.

После этого осторожно добавляли по 60 мкл МТТ (1 мг/мл) в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Затем удаляли среду и добавляли 100 мкл DMSO (“ПанЭко”). Накрывали фольгой и взбалтывали клетки на орбитальном шейкере в течение 15 мин. Регистрировали поглощение при 570 нм (Multiscan FC, “ThermoSpectronic”, США) и нормировали на необработанный контроль (без Dox).

Жизнеспособность клеток рассчитывали по уравнению (1):

$$\text{Жизнеспособность клеток (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{образец}} - \text{OD}_{\text{бланк}}}{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{бланк}}} \times 100\% \quad (1).$$

Статистическая обработка

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка эффективных препаратов для лечения РМЖ является актуальным направлением. Для избирательного накопления лекарственного агента в опухоли особый интерес представляет включение лекарств в содержащие адресный компонент транспортные системы. В качестве адресных молекул могут выступать различные вещества, обладающие сродством к повышенно экспрессирующимся на поверхности опухолевых клеток рецепторам [29–32]. Особое внимание исследователей привлекает сверхэкспрессия интегрина $\alpha_v\beta_3$ и фолатного рецептора (FR) на поверхности опухолевых клеток [29, 30]. В настоящей работе было осуществлено одновременное встраивание двух векторов в фосфолипидную Dox-содержащую композицию с целью повышения накопления лекарства в клетках РМЖ. В качестве адресного компонента к интегрина $\alpha_v\beta_3$ был использован циклический RGD пептид (Arg-Gly-Asp, cRGD), к FR — фолевая кислота в виде пэгиллизованного конъюгата. Свойства полученной композиции Dox с двумя адресными компонентами (NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)) оценивали в сравнении с композициями без адресных молекул (NPh-Dox) и с вариантами каждой адресной молекулы в отдельности (NPh-Dox-cRGD, NPh-Dox-Fol(3,4)). В таблице 2 представлены результаты исследования физико-химических свойств полученных композиций.

Все полученные композиции были относительно однородны по размеру частиц. Дополнительное внесение адресного компонента способствовало укрупнению размера частиц. Согласно литературным данным [33], частицы размером от 2 нм до 200 нм во многих исследованиях показали более высокую скорость накопления в опухоли, поскольку они не распознаются ретикулоэндотелиальной системой (РЭС) и не фильтруются почками [33]. Размер частиц в исследуемой фосфолипидной композиции с двумя адресными агентами составлял $39,62 \pm 4,61$ нм. Встраивание пептидного адресного лиганда приводило к двукратному увеличению размера частиц в системе, в отличие от фолатного вектора, практически не влиявшего на данный параметр.

Другим важным показателем характеристики свойств наносистем является ζ -потенциал, характеризующий стабильность полученных композиций. В литературе встречается следующая классификация НЧ-дисперсий по значению ζ -потенциала: ± 0 –10 мВ (нестабильные), ± 10 –20 мВ (относительно стабильные), ± 20 –30 мВ (умеренно стабильные) и $> \pm 30$ мВ (высокостабильные) [34].

Измерения ζ -потенциала обеспечивают точный анализ электронного состояния поверхности НЧ, а полученные данные можно использовать для прогнозирования стабильности составов, содержащих эти НЧ. Нестабильность может возникнуть в результате взаимодействия между слабо заряженными или незаряженными НЧ, что приводит к образованию агрегатов [35, 36]. Исследование значений ζ -потенциала разработанных композиций показало низкие значения для всех вариантов — менее 10 мВ, что свидетельствует об их нестабильности в течение длительного времени. Поэтому все необходимые эксперименты необходимо проводить в течение суток после приготовления образцов. Соответственно, для получения готовых форм препарата необходимо использование криопротекторов с последующим лиофильным высушиванием.

Степень включения лекарства в фосфолипидные НЧ, как одну из важных характеристик транспортных наносистем, оценивали с использованием метода ультрафильтрации. Во всех образцах фосфолипидных композиций Dox практически полностью встраивался в НЧ; процент включения составлял не менее 99% (табл. 2). Аналогичные данные получены нами практически для всех разрабатываемых композиций [26, 27, 37], что свидетельствует об эффективности выбранного способа и условий получения.

Стабильность наноэмульсий характеризует сохранность агрегатного состояния системы в процессе хранения, поскольку их главным недостатком является подверженность частиц агломерации и выпуску лекарств из НЧ в течение некоторого времени [38]. Поэтому оценка стабильности является основным этапом проверки свойств разрабатываемых нанокомпозиций. В нашем исследовании были оценены изменения размера частиц, индекса полидисперсности (Pdl) при инкубации ($t=25 \pm 3^\circ\text{C}$) в различных средах (вода, фосфатно-солевой буфер и среда для инкубации клеток DMEM) с целью установления предпочтительного растворителя в экспериментах *in vitro*. Данные по изменению размера частиц представлены на рисунке 1.

Исследования изменения размера частиц показали, что в воде (рис. 1А) размер частиц увеличивается на 10 нм во всех образцах уже через 15 мин инкубации. При этом существенных изменений размера частиц при инкубации в PBS (рис. 1Б) и в среде DMEM (рис. 1В) не отмечено; однако размер частиц уже в начальной точке (сразу после разведения) был выше значений для соответствующих композиций практически в 1,5 раза, то есть в данных

Таблица 2. Физико-химические свойства фосфолипидных композиций Dox

Показатели \ Образцы	NPh-Dox	NPh-Dox-cRGD	NPh-Dox-Fol(3,4)	NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)
Размер частиц, нм (% частиц)	$20,80 \pm 0,92$ ($99,87 \pm 0,1\%$)	$44,68 \pm 0,93$ ($100 \pm 0\%$)	$24,73 \pm 0,79$ ($100 \pm 0\%$)	$39,62 \pm 4,61$ ($99,85 \pm 0,21\%$)
ζ -потенциал, мВ	$8,50 \pm 0,12$	$7,66 \pm 0,35$	$9,11 \pm 0,34$	$4,17 \pm 0,83$
Процент Dox, включённого в НЧ, %	$99,9 \pm 0,14$	$99,65 \pm 0,49$	$99,51 \pm 0,15$	$99,85 \pm 0,21$

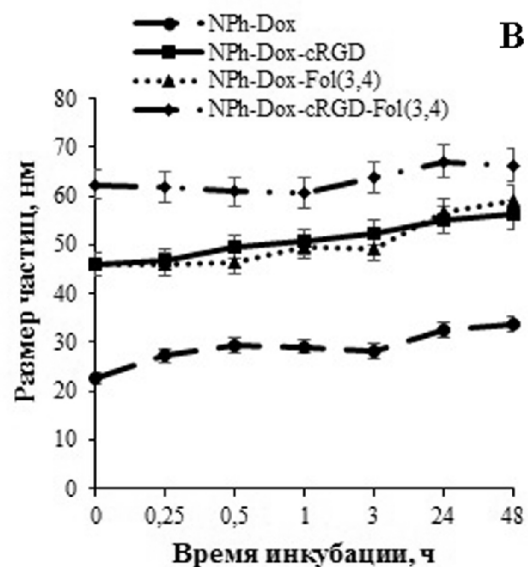
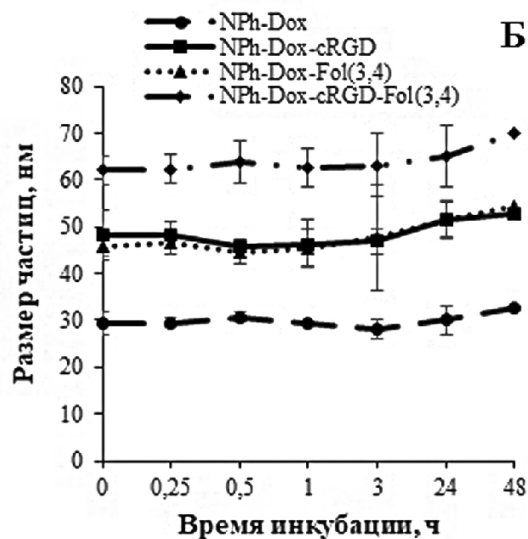
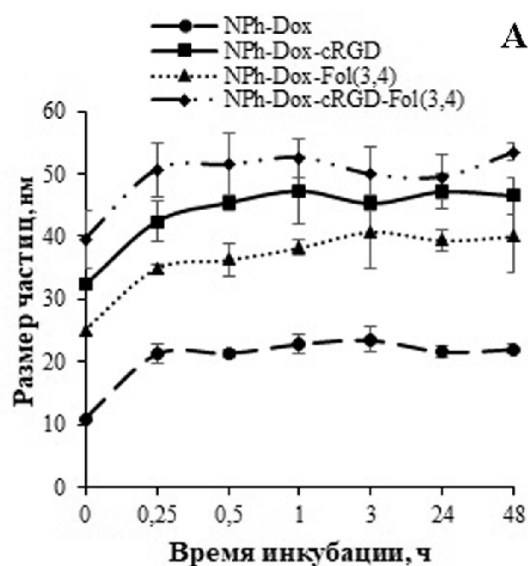


Рисунок 1. Исследование размера частиц полученных композиций при температуре $25 \pm 3^\circ\text{C}$ в зависимости от времени инкубации. NPh-Dox-cRGD, NPh-Dox, NPh-Dox-Fol(3,4) и NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4) разводили в: **А)** воде, **Б)** PBS, **В)** DMEM, $n=3$.

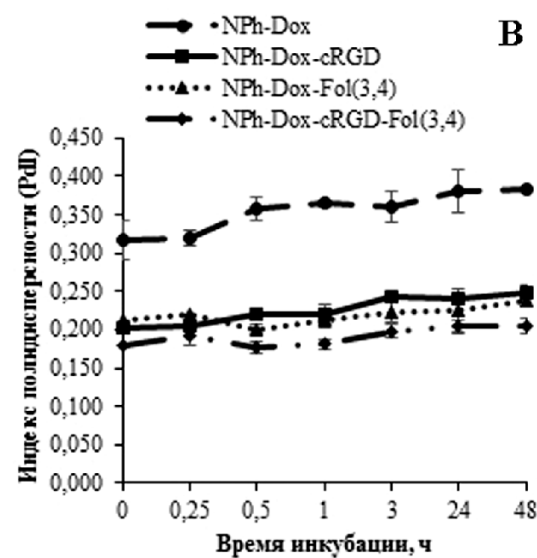
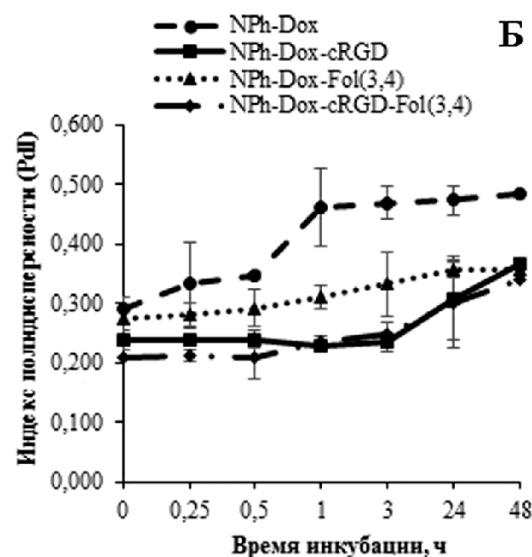
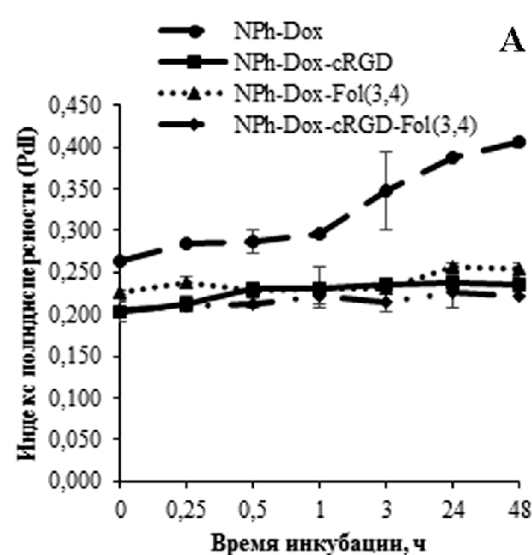


Рисунок 2. Изменение индекса полидисперсности (PdI) полученных композиций при температуре $25 \pm 3^\circ\text{C}$ в зависимости от времени инкубации. NPh-Dox-cRGD, NPh-Dox, NPh-Dox-Fol(3,4) и NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4) разводили в: **А)** воде, **Б)** PBS, **В)** DMEM, $n=3$.

растворителях (PBS и DMEM) изначально происходило укрупнение частиц, возможно, за счёт их слияния. Через 24 ч для композиции NPh-Dox было отмечено увеличение размера частиц на 5 нм (рис. 1B), а для NPh-Dox-cRGD и NPh-Dox-Fol(3,4) — на 10 нм.

В среде DMEM (рис. 2B) отмечена высокая степень стабильности по значениям PdI в течение 48 ч в образцах с адресными фрагментами. Частицы были более однородны, так как индекс полидисперсности находился в пределах 0,300. Для фосфолипидной композиции (NPh-Dox) наблюдалось достаточно высокое значение PdI, что свидетельствует о наличии частиц другого размера, однако в общем объёме их процент был достаточно невелик. При этом в буферном растворе (PBS) (рис. 2Б) к 48 ч было отмечено повышение значений PdI для композиций с адресными векторами (NPh-Dox-cRGD, NPh-Dox-Fol(3,4) и NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)), что свидетельствовало об изменении состава частиц, распределение становилось более широким (неоднородным). В воде (рис. 2А) была практически схожая картина, показывающая, что частицы с адресным фрагментом были более стабильными. Для фосфолипидной композиции без адресных лигандов через 24 ч наблюдалось увеличение значения PdI. С целью стабилизации фосфолипидной композиции NPh-Dox в работах прошлых лет вводили криопротектор и проводили лиофильное высушивание [27].

Результаты исследования процента включения Dox в НЧ через 1 ч и 24 ч инкубации представлены в таблице 3.

В воде через 24 ч инкубации было отмечено снижение процента Dox, включённого в НЧ. Однако для композиции, содержащей два адресных вектора, процент включения снижался в меньшей степени по сравнению с другими образцами и составлял более 90%. При инкубации в PBS также наблюдалось снижение данного показателя аналогично варианту с водой. Через 24 ч процент включения был не ниже 91%. Исследование стабильности в среде DMEM показало её высокую степень в процессе хранения в течение 24 ч.

Таблица 3. Процент включения Dox в НЧ при инкубации в различных средах

Образцы	Время инкубации, ч		
	0	1	24
H ₂ O			
NPh-Dox	95,90±0,13	84,33±0,39	70,10±0,55
NPh-Dox-cRGD	99,80±0,19	95,91±0,21	86,13±0,34
NPh-Dox-Fol(3,4)	99,50±0,23	92,17±0,13	83,00±0,17
NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)	99,75±0,09	97,00±0,49	91,01±0,15
PBS			
NPh-Dox	95,90±0,33	91,41±0,34	91,27±0,16
NPh-Dox-cRGD	98,12±0,11	93,00±0,14	94,00±0,44
NPh-Dox-Fol(3,4)	97,00±0,25	95,45±0,37	94,87±0,11
NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)	99,23±0,15	98,01±0,09	97,33±0,60
DMEM			
NPh-Dox	99,00±0,22	99,11±0,19	99,78±0,09
NPh-Dox-cRGD	99,87±0,04	99,17±0,70	99,89±0,07
NPh-Dox-Fol(3,4)	99,82±0,05	99,62±0,10	99,89±0,05
NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)	99,53±0,08	99,10±0,09	99,91±0,05

Для оценки накопления в клетках была выбрана линия РМЖ (MDA-MB-231), экспрессирующая на своей поверхности интегрин $\alpha_v\beta_3$ и фоллиевый рецептор [39, 40]. Клеточные линии HeLa и Wi-38 были выбраны в качестве контрольных. Клеточная линия HeLa экспрессирует фоллиевый рецептор, но она интегрин $\alpha_v\beta_3$ -отрицательна. Клеточная линия Wi-38, наоборот, FR-отрицательна, но интегрин $\alpha_v\beta_3$ -положительна [41–43].

Исследование на клеточной культуре MDA-MB-231 (рис. 3А) показало некоторую зависимость наличия в Dox-содержащей фосфолипидной наносистеме адресного лиганда. Максимальные значения общего накопления лекарства были отмечены при использовании композиции с двумя векторами (1,26 мкг/мг белка), превышающие значения с каждым отдельным вектором (Fol и cRGD) на 19,8% и 12,7% соответственно. В свою очередь, значения для данной композиции с двумя векторами в зависимости от используемой клеточной линии были различны. Так, на Wi-38 общее накопление составляло 0,88 мкг/мг белка, а на HeLa — 0,48 мкг/мг белка.

Для клеточной линии HeLa (рис. 3Б) результаты по общему накоплению показали повышение в 2 раза накопления лекарства при использовании фоллатного вектора по сравнению со свободным Dox.

Согласно литературным данным, на контрольной линии Wi-38 (рис. 3В) должны были проявить себя образцы с RGD-пептидом. Полученные результаты по данным общего накопления показали, что композиция с пептидным вектором проявляла меньшее влияние по сравнению с двухвекторной композицией (NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)). При этом фоллатный вектор в композиции NPh-Dox-Fol(3,4) показал на этой линии клеток большее влияние наряду со свободным Dox.

Следует отметить, что ожидаемый эффект на контрольных линиях получен не был. Однако на клетках РМЖ, экспрессирующих оба рецептора (интегрин и FA), получены данные, свидетельствующие о проявлении адресного действия фосфолипидной композиции с двумя векторами, прежде всего, за счёт высокой степени интернализации в клетку (рис. 3А).

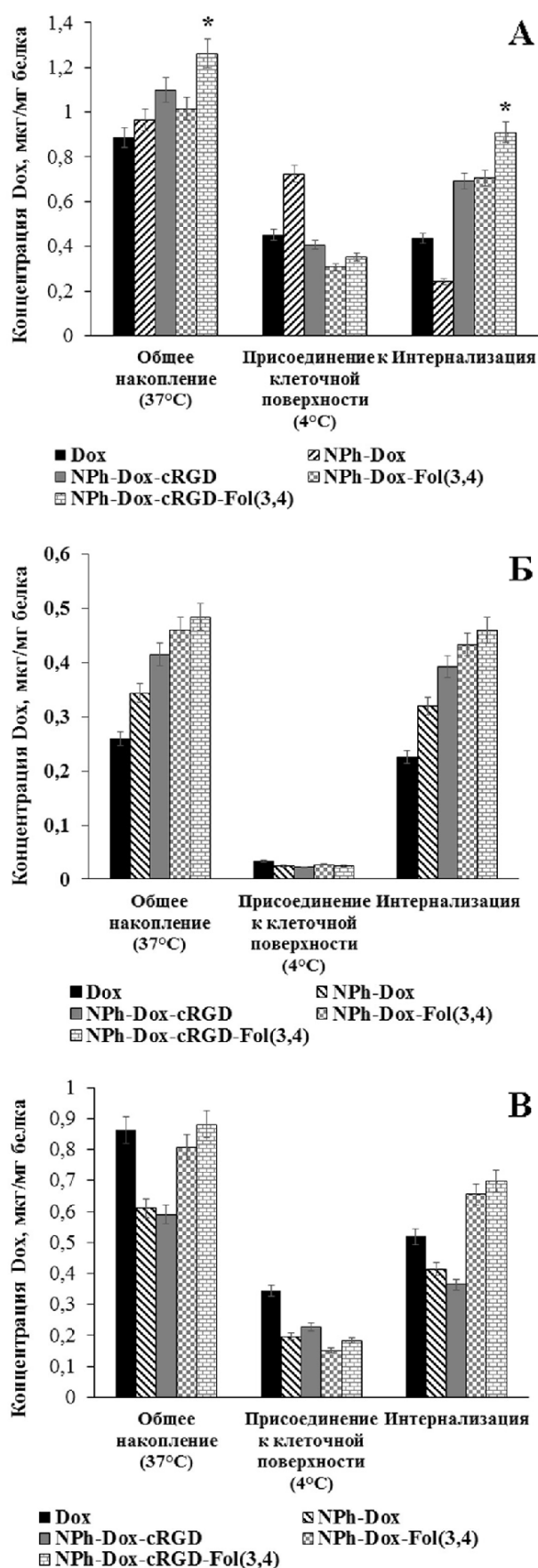


Рисунок 3. Накопление Dox в культуре клеток MDA-MB-231 (А), HeLa (Б) и Wi-38 (В) через 3 ч инкубации с композициями и субстанцией Dox, n=3.

Результаты исследования цитотоксического действия разработанной композиции NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4) представлены на рисунке 4. Инкубация клеток трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 (рис. 4А) с разработанными композициями Dox в течение 24 ч показала, что при концентрациях 5–15 мкг/мл композиции NPh-Dox-Fol(3,4) и NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4) обладают более выраженным цитотоксическим действием. При этом процент гибели опухолевых клеток в варианте инкубирования с композициями NPh-Dox-Fol(3,4) и NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4) (с концентрацией по Dox 15 мкг/мл) был в 1,7 раз выше в сравнении со свободной субстанцией (Dox). Через 48 ч (рис. 4Б) инкубации с веществами наблюдалась та же зависимость от концентрации активного вещества в композиции (практически одинаковая степень влияния на гибель клеток при 0,025 мкг/мл и 0,05 мкг/мл), однако между образцами одной концентрации статистически значимых различий отмечено не было.

Для контрольной линии HeLa процент жизнеспособности клеток был выше, чем для клеток MDA-MB-231 как после 24 ч инкубации, так и после 48 ч (рис. 4В и 4Г). При концентрации 0,025 мкг/мл после 48 ч инкубации достоверных различий в показателе процента жизнеспособности между исследуемыми образцами не зафиксировано, через 24 ч в варианте с фосфолипидной композицией (NPh-Dox) данный показатель при концентрации 0,025 мкг/мл превышал значение свободной субстанции на 7%, а в концентрации 0,05 мкг/мл — на 12%.

Согласно литературным данным [14], адресный RGD пептид избирательно связывается с интегрином $\alpha_v\beta_3$. В связи с этим, соответственно, логично было ожидать несколько иные значения для композиций с данным лигандом (NPh-Dox-cRGD и NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)). Однако на практике достоверных отличий между образцами фосфолипидных композиций не зафиксировано, как и некой зависимости от концентрации (рис. 4Д и 4Е). Лишь в варианте с концентрацией 7,5 мкг/мл при инкубации в течение 48 ч для композиции NPh-Dox-cRGD значение процента жизнеспособности превышало значение для композиции с двумя векторами более чем в 2 раза. То есть в этой концентрации степень цитотоксического действия на здоровые клетки для данного образца была минимальна. Влияние свободной субстанции на диплоидную клеточную линию фибробластов человека Wi-38 было значительно негативнее уже через 24 ч инкубации, при минимальной концентрации (0,025 мкг/мл Dox) живых клеток было меньше в среднем по сравнению с фосфолипидными образцами почти на 15%. С увеличением концентрации активного вещества, как и с увеличением времени инкубации, уровень жизнеспособности клеток снижался. Через 48 ч процент живых клеток при повышении концентрации резко снижался по сравнению с фосфолипидными композициями. Возможно,

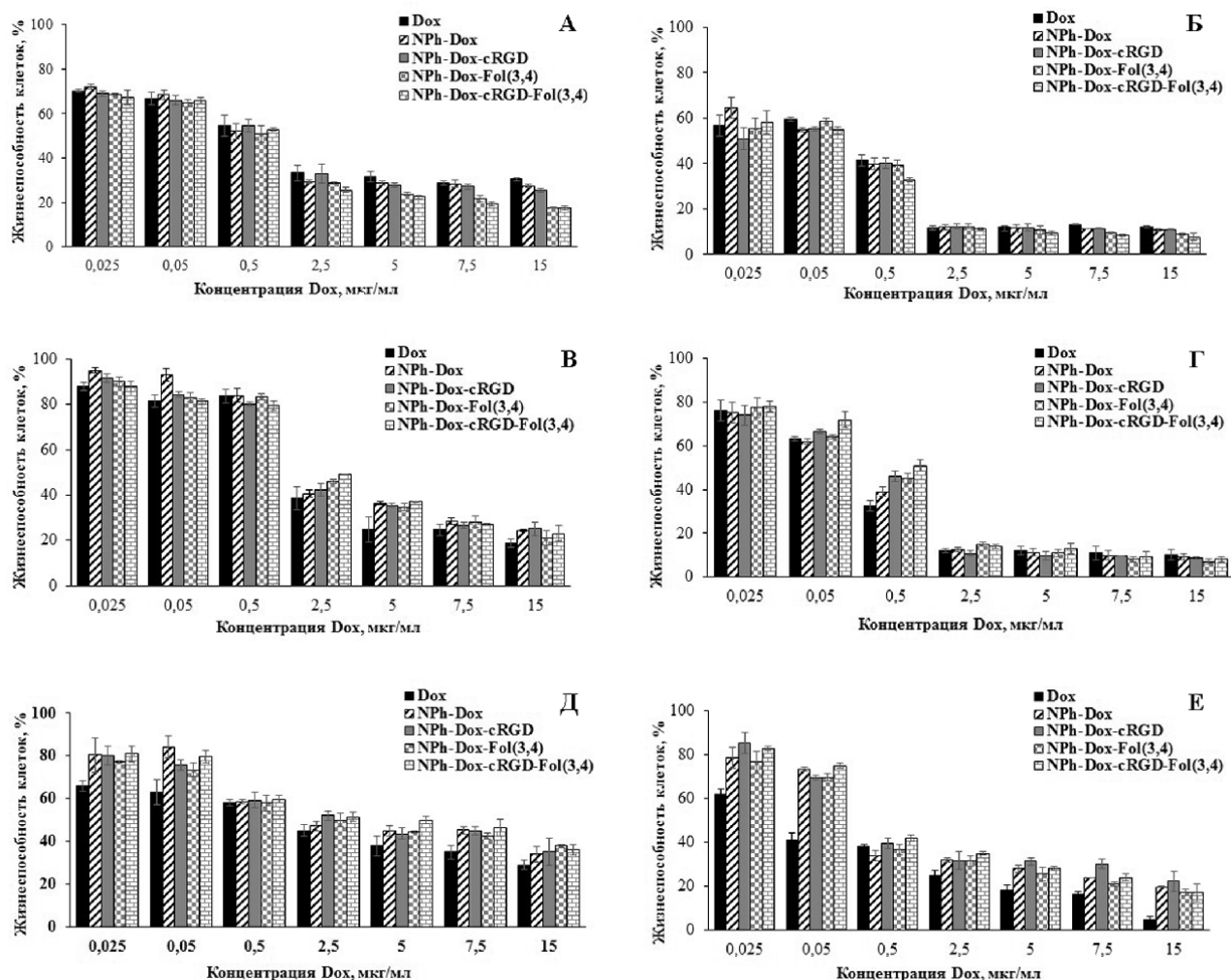


Рисунок 4. Жизнеспособность клеток MDA-MB-231 (А, Б) HeLa (Б, Г) и Wi-38 (Д, Е) после инкубации в течение 24 ч (А, Б, Д) и 48 ч (Б, Г, Е) с композициями и субстанцией Dox в различных концентрациях, $n=3$.

меньшее цитостатическое действие в отношении клеток Wi-38 связано с включением Dox в фосфолипидные НЧ. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что дополнительное встраивание в фосфолипидные НЧ с Dox адресных компонентов не снижало его цитостатического действия на опухолевые клетки (MDA-MB-231 и HeLa), однако в отношении здоровых клеток отмечено меньшее токсическое действие фосфолипидных композиций.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности исследования одновременного применения двух адресных лигандов в одной композиции для повышения эффективности и безопасности использования Dox в терапии опухолей. В то же время целесообразно проведение дополнительных исследований свойств полученной композиции после модификации некоторых параметров: длины линкера в конъюгате с FA для встраивания в фосфолипидные НЧ, соотношения основных компонентов, изменения времени инкубации клеток с исследуемыми веществами. Данные исследования позволят более полно и детально понять потенциал разработанной двухвекторной фосфолипидной композиции Dox.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для повышения эффективности действия Dox, а также снижения МЛУ и уменьшения его токсического проявления разрабатываются системы доставки препарата непосредственно в опухолевые клетки. Для этих целей используют различные векторные соединения, направленные на рецепторы (белки), экспрессирующиеся на поверхности опухоли или опухолевых сосудов. Для повышения вероятности большего накопления в области опухоли используют двух- и трёхвекторные системы доставки лекарств. В нашей работе предложена двухвекторная фосфолипидная система для повышения накопления Dox в клетках РМЖ. Полученная композиция представляет собой ультратонкую эмульсию с размером частиц до 100 нм. При этом практически весь Dox (не менее 98%) встроен в НЧ. Анализ стабильности показал, что композиции стабильны в течение 48 ч в среде, при этом в воде и PBS были отмечены небольшие изменения к 48 ч. Общее накопление и интернализация Dox на клетках MDA-MB-231 при использовании двух адресных векторов повышались в ~1,4 и ~1,3 раза по сравнению с моновекторными композициями.

(NPh-Dox-cRGD и NPh-Dox-Fol(3,4) соответственно). Оценка цитотоксического действия показала большую гибель опухолевых клеток РМЖ MDA-MB-231 при инкубации с композициями NPh-Dox-Fol(3,4) и NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4). При этом на контрольной линии клеток HeLa выраженного цитотоксического действия отмечено не было. Для фосфолипидных композиций, независимо от наличия адресных молекул, на нормальных клетках Wi-38 было показано меньшее цитотоксическое действие по сравнению со свободной субстанцией. Согласно полученным результатам, использование двух векторов перспективно для применения при лечении РМЖ. Интерпретация полученных результатов будет более полной после проведения серии дополнительных экспериментов, в том числе, исследования уровня экспрессии выбранных рецепторов на поверхности опухолевых клеток, результаты которых будут представлены в наших дальнейших публикациях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику лаборатории биосинтеза белка к.б.н. Г.Е. Морозевич за предоставление клеточного материала для экспериментов *in vitro*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-25-00507, <https://rscf.ru/project/23-25-00507/>

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

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. (2022) Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 252 с. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. (2022) Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality). Moscow: P.A. Herzen Research Medical Institute — branch of the Federal State Budgetary Institution "Research Institute of Radiology" of the Ministry of Health of Russia, 252 p.]
- Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**(6797), 747-752. DOI: 10.1038/35021093
- Sorolla A., Sorolla M.A., Wang E., Ceña V. (2020) Peptides, proteins and nanotechnology: A promising synergy for breast cancer targeting and treatment. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **17**(11), 1597-1613. DOI: 10.1080/17425247.2020.181473
- Govender J., Loos B., Marais E., Engelbrecht A.-M. (2014) Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review of the protective role of melatonin. *J. Pineal Res.*, **57**, 367-380. DOI: 10.1111/jpi.12176
- Minko T., Rodriguez-Rodriguez L., Pozharov V. (2013) Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**(13-14), 1880-1895. DOI: 10.1016/j.addr.2013.09.017
- Dobson J. (2006) Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Deliv. Res.*, **67**(1), 55-60. DOI: 10.1002/ddr.20067
- Sun T., Zhang Y.S., Pang B., Hyun D.C., Yang M., Xia Y. (2014) Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie International Edition* England Novel, **53**(46), 12320-12364. DOI: 10.1002/anie.201403036
- Aghebaty-Maleki A., Dolati S., Ahmadi M., Baghbanzadeh A., Asadi M., Fotouhi A., Yousefi M., Aghebaty-Maleki L. (2020) Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *J. Cell Physiol.*, **235**(3), 1962-1972. DOI: 10.1002/jcp.29126
- Dadwal A., Baldi A., Kumar Narang R. (2018) Nanoparticles as carriers for drug delivery in cancer. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **46**(sup2), 295-305. DOI: 10.1080/21691401.2018.1457039
- Shafei A., El-Bakly W., Sobhy A., Wagdy O., Reda A., Aboelenin O., Marzouk A., El Habak K., Mostafa R., Ali M.A., Ellithy M. (2017) A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed. Pharmacother.*, **95**, 1209-1218. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.059
- Wang J., Gong J., Wei Z. (2021) Strategies for liposome drug delivery systems to improve tumor treatment efficacy. *AAPS PharmSciTech*, **23**(1), 27. DOI: 10.1208/s12249-021-02179-4
- Zhang M., Lou C., Cao A. (2022) Progresses on active targeting liposome drug delivery systems for tumor therapy. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **39**(3), 633-638. DOI: 10.7507/1001-5515.202110067
- d'Avanzo N., Torrieri G., Figueiredo P., Celia C., Paolino D., Correia A., Moslova K., Teesalu T., Fresta M., Santos H.A. (2021) LinTT1 peptide-functionalized liposomes for targeted breast cancer therapy. *Int. J. Pharm.*, **597**, 120346. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120346
- Ge L., You X., Huang K., Kang Y., Chen Y., Zhu Y., Ren Y., Zhang Y., Wu J., Qian H. (2017) Screening of novel RGD peptides to modify nanoparticles for targeted cancer therapy. *Biomaterials Science*, **6**(1), 125-135. DOI: 10.1039/c7bm00776k
- Sun Y., Kang C., Liu F., Zhou Y., Luo L., Qiao H. (2017) RGD peptide-based target drug delivery of doxorubicin nanomedicine. *Drug Deliv. Res.*, **78**(6), 283-291. DOI: 10.1002/ddr.21399
- Wu B., Zhao N. (2016) A targeted nanoprobe based on carbon nanotubes – natural biopolymer chitosan composites. *Nanomaterials*, **6**, 216. DOI: 10.3390/nano6110216
- Fong Y.T., Chen C.H., Chen J.P. (2017) Intratumoral delivery of doxorubicin on folate-conjugated graphene oxide by *in-situ* forming thermo-sensitive hydrogel for breast cancer therapy. *Nanomaterials* (Basel), **7**(11), 388. DOI: 10.3390/nano7110388
- Cé R., Couto G.K., Pacheco B.Z., Dallemole D.R., Paschoal J.D., Pacheco B.S., Guterres S.S., Seixas F., Collares T., Pohlmann A.R. (2021) Folic acid-doxorubicin polymeric nanocapsules: A promising formulation for the treatment of triple-negative breast cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **165**, 105943. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105943

19. Kayani Z., Bordbar A.K., Firuzi O. (2018) Novel folic acid-conjugated doxorubicin loaded β -lactoglobulin nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, **107**, 945-956. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.047
20. Lale S.V., Kumar A., Prasad S., Bharti A.C., Koul V. (2015) Folic acid and trastuzumab functionalized redox responsive polymersomes for intracellular doxorubicin delivery in breast cancer. *Biomacromolecules*, **16**(6), 1736-1752. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00244
21. 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. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **169**, 778-782.] DOI: 10.1007/s10517-020-04977-5
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/PBMC20176301056
23. Zykova M.G., Medvedeva N.V., Torkhovskaya T.I., Tikhonova E.G., Prozorovskii V.N., Zakharova T.S., Ipatova O.M. (2012) Influence of doxorubicin inclusion into phospholipid nanoformulation on its antitumor activity in mice: Increased efficiency for resistant tumor model. *Experimental Oncology*, **34**, 323-326.
24. Зыкова М.Г., 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 нанокомпозиции. *Биомедицинская химия*, **57**(2), 174-179. [Zykova M.G., Ipatova O.M., Prozorovskii 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
25. Song Z., Lin Y., Zhang X., Feng C., Lu Y., Gao Y., Dong C. (2017) Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system for targeted oral apatinib administration: enhanced cellular uptake and improved therapeutic effects. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 1941-1958. DOI: 10.2147/IJN.S125573
26. 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
27. Tikhonova E.G., Sanzhakov M.A., Tereshkina Yu.A., Kostryukova L.V., Khudoklinova Yu.Yu., 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
28. Sheldon K., Liu D., Ferguson J., Gariepy J. (1995) Lologomers: Design of *de novo* peptide-based intracellular vehicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(6), 2056-2060. DOI: 10.1073/pnas.92.6.2056
29. Farran B., Montenegro R.C., Kasa P., Pavitra E., Huh Y.S., Han Y.K., Kamal M.A., Nagaraju G.P., Rama Raju G.S. (2020) Folate-conjugated nanovehicles: Strategies for cancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C*, **107**, 110341. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110341
30. Cheng T.M., Chang W.J., Chu H.Y., de Luca R., Pedersen J.Z., Incerpi S., Li Z.L., Shih Y.J., Lin H.Y., 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
31. Li R., Peng Y., Pu Y., Zhao Y., Nie R., Guo L., Wu Y. (2022) Fructose and biotin co-modified liposomes for dual-targeting breast cancer. *J. Liposome Res.*, **32**(2), 119-128. DOI: 10.1080/08982104.2021.1894171
32. Janani S.K., Dhanabal S.P., Sureshkumar R., Nikitha Upadhyayula S.S. (2022) Anti-nucleolin aptamer as a boom in rehabilitation of breast cancer. *Curr. Pharm. Des.*, **28**(38), 3114-3126. DOI: 10.2174/1381612828666220928105044
33. Yetisgin A.A., Cetinel S., Zuvin M., Kosar A., Kutlu O. (2020) Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. *Molecules*, **25**(9), 2193. DOI: 10.3390/molecules25092193
34. Bhattacharjee S. (2016) DLS and zeta potential — What they are and what they are not? *J. Control. Release*, **235**, 337-351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017
35. Manaia E.B., Abuçafy M.P., Chiari-Andréo B.G., Silva B.L., Oshiro Junior J.A., Chiavacci L.A. (2017) Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 4991-5011. DOI: 10.2147/IJN.S133832
36. Xian H.W., Sidik N.A.C., Saidur R. (2020) Impact of different surfactants and ultrasonication time on the stability and thermophysical properties of hybrid nanofluids. *Int. Commun. Heat Mass Transf.*, **110**, 104389. DOI: 10.1016/j.icheatmasstransfer.2019.104389
37. Torkhovskaya T.I., Kostryukova L.V., Tereshkina Y.A., Tikhonova E.G., Morozovich G.E., Plutinskaya A.D., Lupatov A.Yu., Pankratov A.A. (2021) Chlorin e6 embedded in phospholipid nanoparticles equipped with specific peptides: Interaction with tumor cells with different aminopeptidase N expression. *Biomed. Pharmacother.*, **134**, 111154. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111154
38. Wang Y., Zheng Y., Zhang L., Wang Q., Zhang D. (2013) Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J. Control. Release*, **172**(3), 1126-1141. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.08.006
39. Gai Y., Jiang Y., Long Y., Sun L., Liu Q., Qin C., Zhang Y., Zeng D., Lan X. (2020) Evaluation of an integrin $\alpha v \beta 3$ and aminopeptidase N dual-receptor targeting tracer for breast cancer imaging. *Molecular Pharmaceutics*, **17**(1), 349-358. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01134

40. Das D., Koirala N., Li X., Khan N., Dong F., Zhang W., Mulay P., Shrikhande G., Puskas J., Drazba J., McLennan G. (2020) Screening of polymer-based drug delivery vehicles targeting folate receptors in triple-negative breast cancer. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, **31**(11), 1866-1873. DOI: 10.1016/j.jvir.2020.05.010
41. Yoshida T., Oide N., Sakamoto T., Yotsumoto S., Negishi Y., Tsuchiya S., Aramaki Y. (2006) Induction of cancer cell-specific apoptosis by folate-labeled cationic liposomes. *J. Control. Release*, **111**(3), 325-332. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.12.016
42. Lanza P., Felding-Habermann B., Ruggeri Z.M., Zanetti M., Billetta R. (1997) Selective interaction of a conformationally-constrained Arg-Gly-Asp (RGD) motif with the integrin receptor $\alpha_v\beta_3$ expressed on human tumor cells. *Blood Cells Mol. Dis.*, **23**(2), 230-241. DOI: 10.1006/bcmd.1997.0140
43. Akhtar K., Broekelmann T.J., Song H., Turk J., Brett T.J., Mechem R.P., Adair-Kirk T.L. (2011) Oxidative modifications of the C-terminal domain of tropoelastin prevent cell binding. *J. Biol. Chem.*, **286**(15), 13574-13582. DOI: 10.1074/jbc.M110.192088

Поступила в редакцию: 08. 09. 2023.
 После доработки: 17. 10. 2023.
 Принята к печати: 14. 11. 2023.

A DUAL-VECTOR PHOSPHOLIPID NANOSYSTEM OF DOXORUBICIN: ACCUMULATION AND CYTOTOXIC EFFECT IN BREAST CANCER CELLS *IN VITRO*

Yu.A. Tereshkina, F.N. Bedretdinov, L.V. Kostryukova*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: kostryukova87@gmail.com

Various chemotherapeutic agents are used to treat breast cancer (BC); one of them is the anthracycline antibiotic doxorubicin (Dox), which, in addition to its cytostatic effect, has serious side effects. In order to reduce its negative impact on healthy organs and tissues and to increase its accumulation in tumors, Dox was incorporated into phospholipid nanoparticles. The additional use of vector molecules for targeted delivery to specific targets can increase the effectiveness of Dox due to higher accumulation of the active substance in the tumor tissue. The integrin $\alpha_v\beta_3$, which plays an important role in cancer angiogenesis, and the folic acid receptor, which is responsible for cell differentiation and proliferation, have been considered in this study as targets for such vector molecules. Thus, a phospholipid composition of Dox containing two vector ligands, cRGD peptide and folic acid (NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)), was prepared. Study of the physical properties of the developed composition NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4) showed that the average particle size was 39.62 ± 4.61 nm, the ζ -potential value was 4.17 ± 0.83 mV. Almost all Dox molecules were incorporated into phospholipid nanoparticles ($99.85 \pm 0.21\%$). The simultaneous use of two vectors in the composition led to an increase in the Dox accumulation in MDA-MB-231 BC cells by almost 20% as compared to compositions containing each vector separately (folic acid or the cRGD peptide). Moreover, the degree of Dox internalization was 22% and 24% higher than in the case of separate use of folic acid and cRGD peptide, respectively. The cytotoxic effect on MDA-MB-231 cells was higher during incubations with the compositions containing folic acid as a single vector (NPh-Dox-Fol(3,4)) and together with the RGD peptide (NPh-Dox-cRGD-Fol(3,4)). Experiments on the Wi-38 diploid fibroblast cell line have shown a significantly lower degree of cytotoxic effect of the phospholipid composition, regardless of the presence of the vector molecules in it, as compared to free Dox. The results obtained indicate the potential of using two vectors in one phospholipid composition for targeted delivery of Dox.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: breast cancer; phospholipid nanoparticles; cRGD; integrin $\alpha_v\beta_3$; chemotherapy; doxorubicin; folate receptor

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 23-25-00507, <https://rscf.ru/en/project/23-25-00507/>

Received: 08.09.2023; revised: 17.10.2023; accepted: 14.11.2023.