

ВЛИЯНИЕ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ДВУХ АДРЕСНЫХ ВЕКТОРОВ cRGD ПЕПТИДА И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ С ОДИНАКОВОЙ ДЛИНОЙ ЛИНКЕРА НА СВОЙСТВА ФОСФОЛИПИДНОЙ КОМПОЗИЦИИ ДОКСОРУБИЦИНА: ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ *IN VITRO*

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

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

Серьёзные побочные проявления химиотерапевтического препарата доксорубин побуждают исследователей к разработке систем его направленной доставки к клеткам-мишеням. В данной работе мы продолжили исследование по влиянию использования двух векторов в фосфолипидной системе доставки доксорубина (Dox) для таргетной терапии рака молочной железы. Была получена композиция NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) с одинаковой длиной линкера для обоих адресных лигандов — cRGD и фолиевой кислоты (PEG 2000). Полученная композиция NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) с размером частиц менее 50 нм и с 99% встроенного в наночастицы Dox в эксперименте по высвобождению лекарства при различных значениях pH (5,0 и 7,4) показала более быстрый выход и высокий уровень Dox по сравнению с фосфолипидной наноформой и композицией, содержащей только cRGD пептид. На экспрессирующих фолатный рецептор и интегрин $\alpha_v\beta_3$ клетках рака молочной железы MDA-MB-231 в эксперименте *in vitro* было показано повышение общего накопления и интернализации Dox при инкубации с двухвекторной композицией в сравнении с контрольными образцами. На линии клеток рака молочной железы MCF-7 (экспрессирующей только фолатный рецептор) аналогичный эффект наблюдался при инкубации с одновекторной композицией, содержащей фолиевую кислоту (NPh-Dox-Fol(2,0)). На нормальной клеточной линии Wi-38 значения интернализации и общего накопления лекарства для свободной субстанции и векторных композиций были сопоставимы. Через 24 ч инкубации клеток MDA-MB-231 с Dox-содержащими (в концентрации 10 мкг/мл) образцами самый низкий процент живых клеток наблюдался для исследуемой двухвекторной композиции NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0). На клетках MCF-7 цитотоксическое действие проявлялось в равной степени для исследуемых образцов. Исследование пути клеточной гибели на клетках MDA-MB-231 показало преобладание пути апоптоза (поздний апоптоз), а на MCF-7 — пути некроза. При исследовании клеточного цикла на линии MDA-MB-231 (фолатный рецептор (+) и интегрин $\alpha_v\beta_3$ (+)) отмечено увеличение процента клеток в фазе G0/G1, что свидетельствует об апоптотической гибели клеток при инкубации с NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0). На клетках MCF-7 (фолатный рецептор (+) и интегрин $\alpha_v\beta_3$ (-)) различий между образцами выявлено не было.

Ключевые слова: доксорубин; фосфолипидные наночастицы; рак молочной железы; cRGD пептид; фолиевая кислота; FR α

DOI: 10.18097/PBMCR1538

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из основных проблем здравоохранения. Наиболее часто встречающимися их разновидностями являются рак молочной железы, кожи, предстательной железы, тела матки, ободной кишки [1]. Приоритетным классическим методом лечения злокачественных новообразований является химиотерапия. Наиболее используемым химиопрепаратом для лечения различных типов рака, включая рак молочной железы, является доксорубин (Dox) [2]. Цитотоксическое действие Dox характеризуется несколькими механизмами, такими как (1) интеркаляция ДНК и образование аддуктов, (2) ингибирование топоизомеразы II (TopII), (3) генерация свободных радикалов, окислительный стресс и (4) повреждение мембраны вследствие изменения метаболизма сфинголипидов [3]. Однако, несмотря на высокую эффективность Dox, его применение ограничено серьёзными побочными проявлениями (такими как кардиотоксичность, множественная лекарственная

устойчивость и др.) [4–8]. Использование нанотехнологий и разработка наночастиц (НЧ) позволяет снизить системные побочные эффекты химиотерапевтических агентов и повысить их терапевтическую эффективность. Доставка лекарств в составе НЧ к опухолевым клеткам опосредована патофизическими свойствами опухоли, в частности повышенной её проницаемостью, эффектом удержания, а также её микроокружением [9]. Перспективными лигандами для доставки лекарств к опухоли являются пептиды, содержащие последовательность Asn-Gly-Arg (RGD). Они обладают аффинностью к интегринам клеточной поверхности ($\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_5\beta_1$), которые участвуют в прикреплении клеток к внеклеточному матриксу [10]. Интегрин $\alpha_v\beta_3$ участвует в процессах пролиферации, инвазии и метастазирования опухолевых клеток, в частности рака молочной железы. Опосредованная интегрином адгезия клеток включает активацию ряда киназ [11, 12]. Циклизация RGD пептидов позволяет повысить их стабильность, снизив конформационную гибкость и чувствительность к протеолизу [13, 14].



© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

Фолиевая кислота, взаимодействующая с фолатным рецептором (FR), также является перспективным адресным агентом в доставке лекарств к опухолям. FR представляет собой белок, связанный с гликозилфосфатидилинозитолом. Он практически не экспрессируется в нормальных клетках, в то время как на некоторых опухолевых клетках наблюдается его повышенная экспрессия [15]. Фолиевая кислота связывается с FR, обеспечивая её проникновение в клетку посредством эндоцитоза, с последующим высвобождением в эндосомах [16, 17]. Таким образом, фолиевую кислоту можно использовать в качестве активного нацеливающего агента в системах доставки для повышения эффективности транспортируемого лекарства.

Многими авторами предложен показавший свою перспективность подход использования нескольких адресных лигандов в одной системе доставки для противоопухолевых препаратов [18]. В настоящей работе, полагаясь на исследования в данной области [18], а также на ранее полученные положительные результаты по встраиванию Dox в фосфолипидные НЧ с двумя адресными конъюгатами (DSPE-PEG2000-cRGD и DSPE-PEG3400-Folat) [19], нами была получена двухвекторная композиция Dox, содержащая cRGD пептид и фолиевую кислоту с одинаковой длиной линкера (PEG2000). Целью работы было исследование физических свойств полученной композиции и её взаимодействие с клетками рака молочной железы в условиях *in vitro*, включая клеточное накопление Dox, цитотоксичность, а также пути гибели клеток и клеточный цикл.

МЕТОДИКА

Материалы

В работе была использована субстанция доксорубицина гидрохлорида (г/х) с чистотой 99%, полученная на Омутнинской научной опытно-производственной базе (Россия). Для приготовления НЧ использовали соевый фосфатидилхолин Lipoid S100 ("Lipoid", Германия). Адресный циклический пептид cRGDfC с чистотой не менее 95%, подтверждённой методами ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией и ЯМР-спектроскопией, получен в "Синтон-Лаб" (Россия). Для встраивания адресного пептида в фосфолипидные НЧ использовали DSPE-PEG2000-Maleimide ("Nanosoft Polymers", США). В качестве второго адресного фрагмента использовали конъюгат DSPE-PEG2000-Folat ("Nanosoft Polymers"). В исследовании также использовали фосфатно-солевой буфер (PBS) ("ПанЭко", Россия) и 96% этиловый спирт ("Медхимпром", Россия). Дистиллированную воду готовили с помощью дистиллятора GFL-2004 ("GFL", Германия).

Клеточные культуры инкубировали с использованием питательной среды DMEM, раствора Версена ("ПанЭко") и эмбриональной бычьей сыворотки (ФБС) ("Gibco", США).

Выживаемость опухолевых клеток оценивали с помощью МТТ теста ("Mumbai", Индия). Пути гибели

клеток оценивали с помощью коммерческого набора для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF488 и йодида пропидия ("Lumiprobe", Россия), состоящего из конъюгированного с AF488 аннексина V, йодида пропидия (PI) и буфера, связывающего аннексин. Оценку клеточного цикла проводили с использованием RNAs ("Thermo Scientific", Латвия).

Клеточные линии

В работе использовали клеточные линии рака молочной железы человека (MDA-MB-231 и MCF-7) и диплоидную клеточную линию человека (Wi-38), полученные из Американской коллекции и поддерживаемые в коллекции клеточных культур Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича. Идентификацию клеточных линий проводили с использованием технологии анализа аутосомных STR-локусов ("Gordiz", Россия). Опухолевые клетки культивировали в соответствии с рекомендациями, указанными в сертификатах на клеточные культуры. Клетки инкубировали в культуральной среде DMEM, содержащей 2 mM L-глутамин и 10% FBS в культуральных флаконах площадью 25 см² и 75 см² ("Biology", Китай) при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе Sanyo ("Sanyo", Япония).

Получение фосфолипидных композиций Dox

Конъюгат DSPE-PEG2000-cRGD был получен в соответствии с ранее описанным методом [34, 35]. Композиции Dox с адресными агентами — фолиевой кислотой и пептидом cRGD (NPh-Dox-cRGD, NPh-Dox-Fol(2,0) и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)) — были приготовлены, как описано ранее [28]. Фосфолипидные композиции были приготовлены с использованием соевого фосфолипида Lipoid S100 и адресных конъюгатов плёночным методом. Соотношение Dox:Lipoid и Lipoid:конъюгат (cRGD или Folat) составляло 1:20 (w/w). В полученных Dox-содержащих композициях анализировали размер частиц, дзета(ζ)-потенциал с использованием Zetasizer Malvern ZS ("Malvern Instruments Ltd.", Великобритания), концентрацию препарата и процент его включения в НЧ с использованием жидкостного хроматографа Agilent серии 1100 ("Agilent Technologies", США) с диодно-матричным детектором и программным обеспечением ChemStation Rev. A.09.03.

Высвобождение Dox из НЧ *in vitro*

Высвобождение Dox из НЧ (с адресным конъюгатом и без него) оценивали с использованием диализных мешков (порог отсечения 3,5 кДа) ("Spectrum Labs", Греция). Вкратце, 1 мл тестовых образцов (концентрация Dox составляла 1 мг/мл) в диализных мешках помещали в 25 мл PBS (pH 7,4 и 5,0), затем инкубировали и смешивали при 37°C и 100 об/мин в водяной бане шейкера Grant OLS 200 ("Grant Instruments (Cambridge) Ltd.", Великобритания). Аликвоты супернатанта (1 мл)

отбирали через определённые интервалы для каждого варианта (0,25 ч, 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 5 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч). После каждого отбора проб добавляли равное количество PBS. Концентрацию определяли с помощью спектрофотометра Agilent 8453 (“Agilent Technologies”) при длине волны 254 нм. Скорость высвобождения лекарственного средства рассчитывали путём деления концентрации лекарственного средства (высвобождаемого лекарственного средства из фосфолипидных НЧ) в заданное время на начальную концентрацию лекарственного средства в фосфолипидной НЧ [20].

Оценка клеточного связывания и проникающей способности

Клеточные культуры MDA-MB-231, MCF-7 и Wi-38 (10^6 клеток на лунку) высевали в 6-луночные культуральные планшеты (“Biologux”) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. В качестве сравнения (контроль) использовали свободную субстанцию Dox. Образцы полученных композиций и свободную субстанцию (10 мкг/мл в пересчёте на Dox) инкубировали в течение 24 ч при двух температурных режимах: 37°C в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”) и 4°C в холодильном оборудовании (“АТЛАНТ”, Беларусь). После инкубации и удаления среды клетки дважды промывали PBS. Dox экстрагировали раствором ацетонитрила (“CARLO ERBA Reagents GmbH”, Италия) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (“Acros Organics”, США) — 1 мл на лунку. Собранные экстракты разделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин на настольной центрифуге MiniSpin plus (“Eppendorf”, ротор F-45-12-11, 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”). 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 (связывания с клеточной поверхностью [21]).

Анализ цитотоксичности in vitro

Цитотоксичность разработанных композиций Dox оценивали *in vitro* с помощью теста МТТ. Клетки MDA-MB-231, MCF-7 и Wi-38 (10^5 клеток на лунку) высевали в стерильные 96-луночные культуральные планшеты и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ с использованием CO₂-инкубатора в течение 24–26 ч. Затем добавляли исследуемые образцы в концентрациях Dox 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 24 ч и 48 ч. После этого в каждую лунку осторожно добавляли 50 мкл МТТ (1 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Затем среду осторожно удаляли и добавляли 100 мкл ДМСО (“ПанЭко”). Клетки накрывали фольгой и встряхивали

на орбитальном шейкере в течение 15 мин. Поглощение регистрировали при 570 нм с помощью Multiscan FC (“ThermoSpectronic”, США) и нормализовали по отношению к контролю без Dox.

Анализ пути гибели клеток in vitro

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах до достижения монослоя 80–90%. Затем исследуемые образцы (Dox, NPh-Dox, NPh-Dox-cRGD, NPh-Dox-Fol(2,0) и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)) добавляли в среду (концентрация Dox 0,5 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 ч (37°C, 5% CO₂). Далее клетки дважды отмывали от среды раствором Хэнкса, добавляли растворы трипсина и Версена (1:1) и полученный раствор суспендировали пипетированием. Затем клетки промывали один раз в PBS центрифугированием при 1000 об/мин с использованием MiniSpin plus (“Eppendorf”, ротор F-45-12-11) в течение 4 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл связывающего буфера. Клетки инкубировали с 5 мкл аннексина V-AF488 в тёмном месте в течение 15 мин при комнатной температуре. Без предварительной промывки в каждую пробирку добавляли по 400 мкл 1х аннексина V связывающего буфера (входящего в состав коммерческого набора), добавляли PI и инкубировали в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашивание клеток анализировали с помощью сортировщика проточного цитофлуориметра FACS Aria III (“BD Biosciences”, США), оснащённого синим (488 нм) и жёлто-зелёным (561 нм) лазерами. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения BD FACSDiva версии 7. Графическое представление данных было получено с помощью FlowJo версии 10.

Анализ клеточного цикла in vitro

Клеточные культуры MDA-MB-231, MCF-7 и Wi-38 (10^6 клеток на лунку) высевали в 6-луночные культуральные планшеты (“Biologux”) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Затем в среду добавляли исследуемые образцы доксорубина (Dox, NPh-Dox, NPh-Dox-cRGD, NPh-Dox-Fol(2,0) и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)) с концентрацией Dox 3 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч (37°C, 5% CO₂). Клетки дважды промывали раствором Версена и трипсина (1:1). Затем суспензию клеток промывали ещё дважды холодным PBS, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 4 мин на центрифуге MiniSpin plus. Осадок клеток фиксировали холодным 70% этанолом. После фиксации к клеткам добавляли 2 мкл RNAs (10 мг/мл) (“Thermo Scientific”) и инкубировали их в течение 30 мин при 37°C. Далее к клеткам добавляли 400 мкл PBS и добавляли 5 мкл PI. Окрашивание клеток анализировали с помощью сортировщика проточного цитометра FACS Aria III (“BD Biosciences”), оснащённого синим (488 нм) и жёлто-зелёным (561 нм) лазерами. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva версии 7. Графическое представление данных было получено с помощью FlowJo версии 10.

Для оценки достоверности различий измеряемых параметров по трём повторностям использовали критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Данные на рисунках представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование Dox для лечения злокачественных новообразований ограничено его побочными эффектами из-за неспецифического распределения в организме [5, 7]. Многие исследования направлены на преодоление данных недостатков путём встраивания лекарства в системы доставки [22]. Для снижения неспецифического распределения и повышения накопления лекарства в опухолевых клетках могут быть использованы несколько адресных фрагментов в системах доставки лекарств [18]. Одновременное применение адресных пептидов с RGD-мотивом, направленным на участвующий в адгезии и метастазировании опухоли интегрин $\alpha_v\beta_3$, и фолиевой кислоты, направленной на повышенно экспрессирующийся на поверхности клеток рака молочной железы FR [23], было показано нами ранее в фосфолипидной системе для доставки Dox [19]. Следует отметить, что для каждого векторного компонента использовали разные длины линкера — PEG2000 (для cRGD пептида) и PEG3400 (для фолиевой кислоты) [19]. Размер частиц разработанной композиции составлял $39,62 \pm 4,61$ нм, а ζ -потенциал — $4,17 \pm 0,83$ мВ, общее накопление и интернализация Dox на клетках MDA-MB-231 при инкубации с данной композицией было в $\sim 1,4$ и $\sim 1,3$ раза выше по сравнению с моновекторными композициями. В связи с этим было важно установить связь между используемой для векторов длиной линкеров и свойствами получаемой композиции. Поэтому в данной работе была получена композиция Dox, встроенного в фосфолипидные НЧ с двумя адресными фрагментами, имеющими одинаковую длину линкера (PEG2000) — NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) и изучены её свойства. В качестве образцов сравнения были получены композиции с каждым компонентом отдельно: фосфолипидная композиция (NPh-Dox); фосфолипидная композиция с cRGD пептидом (NPh-Dox-cRGD); фосфолипидная композиция с фолиевой кислотой (NPh-Dox-Fol(2,0)).

Для оценки свойств и стабильности нанопрепаратов, в том числе липосомальных, используют 3 основных параметра — размер наночастиц, индекс полидисперсности “polydispersity index” (PdI) и ζ -потенциал. Результаты исследования физико-химических свойств исследуемых вариантов композиции представлены в таблице 1. Размер частиц во всех образцах композиций составлял менее 50 нм. Добавление адресных конъюгатов приводило к закономерному укрупнению частиц по сравнению с исходной композицией (NPh-Dox). В образце с двумя векторами NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) размер частиц был максимальным и составлял $48,65 \pm 2,93$ нм. В остальных образцах значение данного показателя снижалось в ряду: NPh-Dox-cRGD и NPh-Dox-Fol(2,0). При сравнении полученных значений размера частиц со свойствами предыдущей композиции [19] было выявлено, что использование меньшей длины линкера (“ножки”) не приводило к уменьшению размера частицы.

В фосфолипидных эмульсиях НЧ в одной системе могут быть неоднородными по размеру, то есть полидисперсными. Для систем доставки лекарств на основе липидных везикул величина PdI 0,3 и ниже считается удовлетворительной, свидетельствующая об относительно гомогенной популяции липидных везикул [25]. В нашем исследовании композиции Dox с адресными фрагментами имели значения PdI ниже 0,3, что свидетельствует об их относительной гомогенности. Добавление адресных фрагментов повышало однородность наноземульсий. Величина PdI в композиции NPh-Dox была выше значений для композиций с адресными компонентами и близка к 0,3. Таким образом, согласно полученным результатам по величине PdI, внесение адресных фрагментов (cRGD и Fol(2,0)) приводило к увеличению однородности фосфолипидной композиции.

Величина ζ -потенциала характеризует агрегационную устойчивость частиц в наноземульсии: чем больше его абсолютная величина, тем больший поверхностный заряд имеют частицы, что обеспечивает их электростатическую стабилизацию и увеличивает силы электростатического отталкивания между частицами, предохраняя их от агрегации. Согласно классификации дисперсий НЧ по значению ζ -потенциала [26], полученная композиция NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) является нестабильной (значения ζ -потенциала находятся в пределах $\pm 0-10$ мВ); композиция NPh-Dox —

Таблица 1. Характеристика полученных композиций по размеру частиц и индексу полидисперсности

Композиции	Размер частиц, нм / % частиц данного размера	Индекс полидисперсности (PdI)	Величина ζ - потенциала, мВ	Процент Dox включённого в НЧ, %
NPh-Dox	$19,63 \pm 0,94$ (99,93 \pm 0,06%)	$0,344 \pm 0,049$	$13,50 \pm 3,83$	$99,07 \pm 0,65$
NPh-Dox-cRGD	$37,58 \pm 1,23$ (99,67 \pm 0,40%)	$0,258 \pm 0,050$	$8,77 \pm 1,46$	$99,44 \pm 0,23$
NPh-Dox-Fol(2,0)	$36,50 \pm 1,75$ (99,06 \pm 0,82%)	$0,254 \pm 0,015$	$5,72 \pm 0,40$	$98,89 \pm 0,81$
NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)	$48,65 \pm 2,93$ (98,76 \pm 0,21%)	$0,249 \pm 0,056$	$3,29 \pm 0,84$	$98,98 \pm 0,88$

относительно стабильной (ζ -потенциал ± 10 –20 мВт). Для остальных образцов значение ζ -потенциала было в пределах 10 мВт, то есть встраивание адресных компонентов в композицию приводило к снижению поверхностного заряда частиц, особенно при их одновременном встраивании (табл. 1, рис. 1Б). В предыдущем исследовании нами были получены аналогичные значения для композиций с разными длинами линкеров для векторных лигандов, однако все образцы были достаточно стабильны в различных растворах (инкубационная среда, H_2O , PBS) в течение 3 дней при температуре 25°C [19]. Оценка включения Dox в НЧ показала, что во всех образцах наблюдалось практически полное встраивание субстанции (100%).

Исследование выхода активного компонента — лекарственной субстанции из НЧ — может позволить спрогнозировать “поведение” полученной наноконструкции в определенных биологических условиях. В эндосомах или лизосомах опухолевых клеток естественный градиент pH составляет 4,0–6,5, а в микроокружении опухоли — 6,5–7,2 [27]. Таким образом, моделирование данных условий позволит понять степень и время высвобождения Dox из фосфолипидных НЧ.

При инкубации исследуемых образцов фосфолипидных композиций в PBS с pH 7,4 (рис. 2А) было обнаружено постепенное увеличение уровня лекарства в растворе. В образцах NPh-Dox-Fol(2,0) и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) максимальное высвобождение Dox было отмечено

уже через 5 ч и составляло около 50% от начального содержания. Для остальных образцов уровень высвобождения лекарства был меньше — в пределах 40%. При значении pH 5,0 (рис. 2Б) отмечен более быстрый выход Dox из НЧ. Через 2 ч инкубации для образцов NPh-Dox-Fol(2,0) и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) степень высвобождения составляла около 42–50%, для остальных образцов в этой временной точке уровень высвобождения не превышал 30%. Через 72 ч инкубации образцов наблюдалось высвобождение 68% лекарства для NPh-Dox-Fol(2,0) и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0).

Оценку клеточного накопления Dox при инкубации с полученными композициями в условиях *in vitro* проводили на клеточных линиях рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7, фибробластов человека Wi-38 (контрольная линия). В данном исследовании в качестве экспрессирующихся на поверхности клеток мишеней были рассмотрены отвечающий за адгезию и метастазирование интегрин $\alpha_v\beta_3$ и FR. Согласно данным литературы, на клеточной поверхности MDA-MB-231 обнаруживаются как интегрин $\alpha_v\beta_3$, так и FR [28, 29], на поверхности клеток MCF-7 интегрин $\alpha_v\beta_3$ отсутствует [30], а FR обнаруживается [31]. Клетки фибробластов человека Wi-38 не обладают способностью экспрессировать FR, но интегрин $\alpha_v\beta_3$ обнаруживается на их поверхности [32, 33].

Исследование клеточного накопления лекарства проводили через 24 ч инкубации выбранных клеточных линий с разработанными композициями

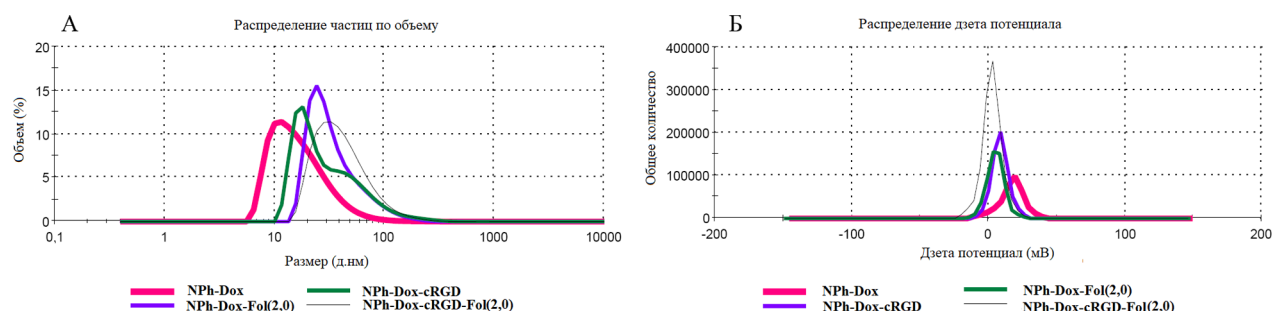


Рисунок 1. Распределение размера частиц (диаметр) (А) и ζ -потенциал водных растворов (Б) фосфолипидных композиций Dox.

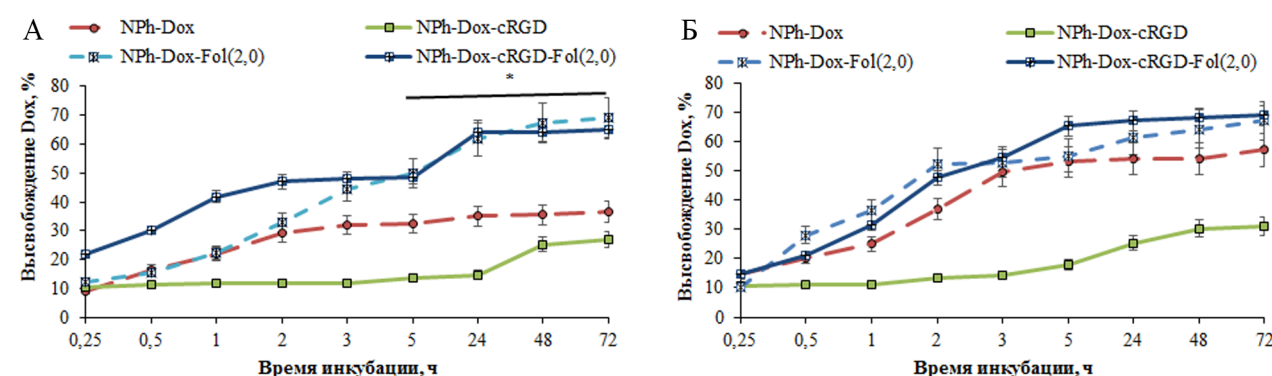


Рисунок 2. Высвобождение Dox из наночастиц методом диализа при инкубации исследуемых образцов фосфолипидных композиций в растворах с pH 7,4 (А) и pH 5,0 (Б). * $p < 0,05$ по сравнению с фосфолипидной наночастицей (NPh-Dox).

(концентрация по Dox 10 мкг/мл). На клеточной линии MDA-MB-231 максимальное общее накопление было отмечено для вариантов композиций с двумя векторами (рис. 3А). Это значение было более чем в 2 раза выше, чем для свободной субстанции, и на 35% выше, чем для фосфолипидной композиции. Наличие в композиции каждого вектора отдельно повышало уровень общего накопления лекарства, при этом влияние фолиевой кислоты было выше, чем cRGD-пептида.

Прикрепление к клеточной поверхности было одинаковым для NPh-Dox, NPh-Dox-cRGD и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0). При этом количество связанного с поверхностью клеток Dox было выше по сравнению со свободной субстанцией и композицией с двумя пептидами на 30%. Однако расчёт интернализации показал больший эффект для NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) по сравнению как с композицией с фолиевой кислотой (NPh-Dox-Fol(2,0)), так и особенно со свободной субстанцией. Влияние RGD-пептида в интернализацию Dox было минимальным, значения были сопоставимы с фосфолипидной формой (NPh-Dox).

Оценка накопления на второй клеточной линии рака молочной железы MCF-7, которая экспрессирует на своей поверхности только фолиевый рецептор [31], показала несколько иные значения (рис. 3Б). Максимальное общее накопление (при 37°C) отмечено для композиции NPh-Dox-Fol(2,0), превышающее значение для фосфолипидной наноформы и свободной субстанции в 2,4 и 3,11 раз соответственно. Для NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) уровень общего накопления был выше фосфолипидной формы более, чем в 2 раза. Для композиции с пептидом (NPh-Dox-cRGD) значение общего накопления Dox ожидаемо близко к фосфолипидной форме, поскольку на поверхности данной линии клеток экспрессия интегрин $\alpha_v\beta_3$ отсутствует [53], а FR наблюдается. Связывание лекарства с клеточной поверхностью было ниже, чем для предыдущей линии клеток. Расчёт количества Dox, прошедшего в внутрь клетки (интернализация) показал такой же эффект, что и в общем накоплении, где максимальное количество цитостатика обнаруживалось при инкубации с NPh-Dox-Fol(2,0). При этом для NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) данное значение было несколько ниже по сравнению с композицией, содержащей только фолиевую кислоту (на 11,3%). Можно предположить, что в данном случае наличие RGD-пептида в композиции каким-то образом мешало проникновению лекарства внутрь клетки.

Для всех содержащих адресные компоненты композиций значения общего накопления и интернализации на линии Wi-38 (рис. 3В) были ниже, по сравнению с фосфолипидной наноформой. Прикрепление к поверхности клеток было неожиданно максимальным для образца с двумя векторами (NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)).

Цитотоксический эффект полученных композиций был изучен на выбранных клеточных линиях MDA-MB-231, MCF-7 и Wi-38. Результаты

исследования показали дозозависимый эффект для всех вариантов (рис. 4). С увеличением продолжительности инкубации с образцами до 48 ч процент живых клеток снижался для всех клеточных линий. На линии MDA-MB-231 через 24 ч при концентрации Dox в образцах до 1 мкг/мл наблюдалась большая степень влияния свободной субстанции (рис. 4А). При концентрации Dox в образцах 2,5 мкг/мл и выше наблюдалось выравнивание значений жизнеспособности опухолевых клеток между образцами (около 50%). Однако процент живых клеток при инкубации с NPh-Dox-Fol(2,0) был выше, чем для свободной субстанции. Минимальный процент живых клеток через 24 ч инкубации наблюдался для NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) с концентрацией Dox 10 мкг/мл. Через 48 ч инкубации для всех Dox-содержащих конструкций (в диапазоне концентраций от 0,125 мкг/мл до 5 мкг/мл) были показаны практически равные значения со свободной субстанцией, то есть встраивание лекарства в НЧ с векторами не приводило к снижению его цитостатического действия (рис. 4Б). При концентрации по Dox 10 мкг/мл отмечена максимальная гибель клеток во всех вариантах инкубирования с фосфолипидными композициями, в среднем процент живых клеток в этих образцах был ниже на 30%, чем для свободной субстанции. Также стоит отметить, что при инкубации клеток с содержащей cRGD-пептид композицией наблюдался наименьший процент живых клеток по сравнению со свободным лекарством (на 10%).

Цитотоксическое действие разработанных композиций на клетках MCF-7 через 24 ч инкубации проявлялось в большей степени для образцов, содержащих фолиевую кислоту, особенно при концентрациях Dox 5 мкг/мл и 10 мкг/мл (рис. 4В). При концентрации 10 мкг/мл наибольшее токсическое действие показала композиция NPh-Dox-Fol(2,0). Через 48 ч процент живых клеток при всех исследуемых концентрациях для фосфолипидных образцов был примерно одинаковым со значениями для свободной субстанции, кроме концентрации 1 мкг/мл (рис. 4Г), где процент живых клеток для свободной Dox был значительно ниже остальных. Кроме того, начиная с концентрации 2,5 мкг/мл наблюдалось резкое снижение количества живых клеток. При этом стоит отметить, что композиции, содержащие фолиевую кислоту (NPh-Dox-Fol(2,0), NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)), оказывали наибольшее токсическое действие на данную клеточную линию при концентрации 10 мкг/мл по Dox (4% живых клеток).

Исследование влияния композиций Dox на выживаемость клеток Wi-38 при инкубации 24 ч (рис. 4Д) показало, что через 24 ч и 48 ч фосфолипидные композиции в меньшей степени оказывали цитотоксическое действие по сравнению со свободной субстанцией Dox, особенно при концентрациях последнего более 1 мкг/мл. Так как на поверхности клеток Wi-38 обнаруживается интегрин $\alpha_v\beta_3$ [33], логично было предположить, что cRGD-содержащие композиции могут оказывать

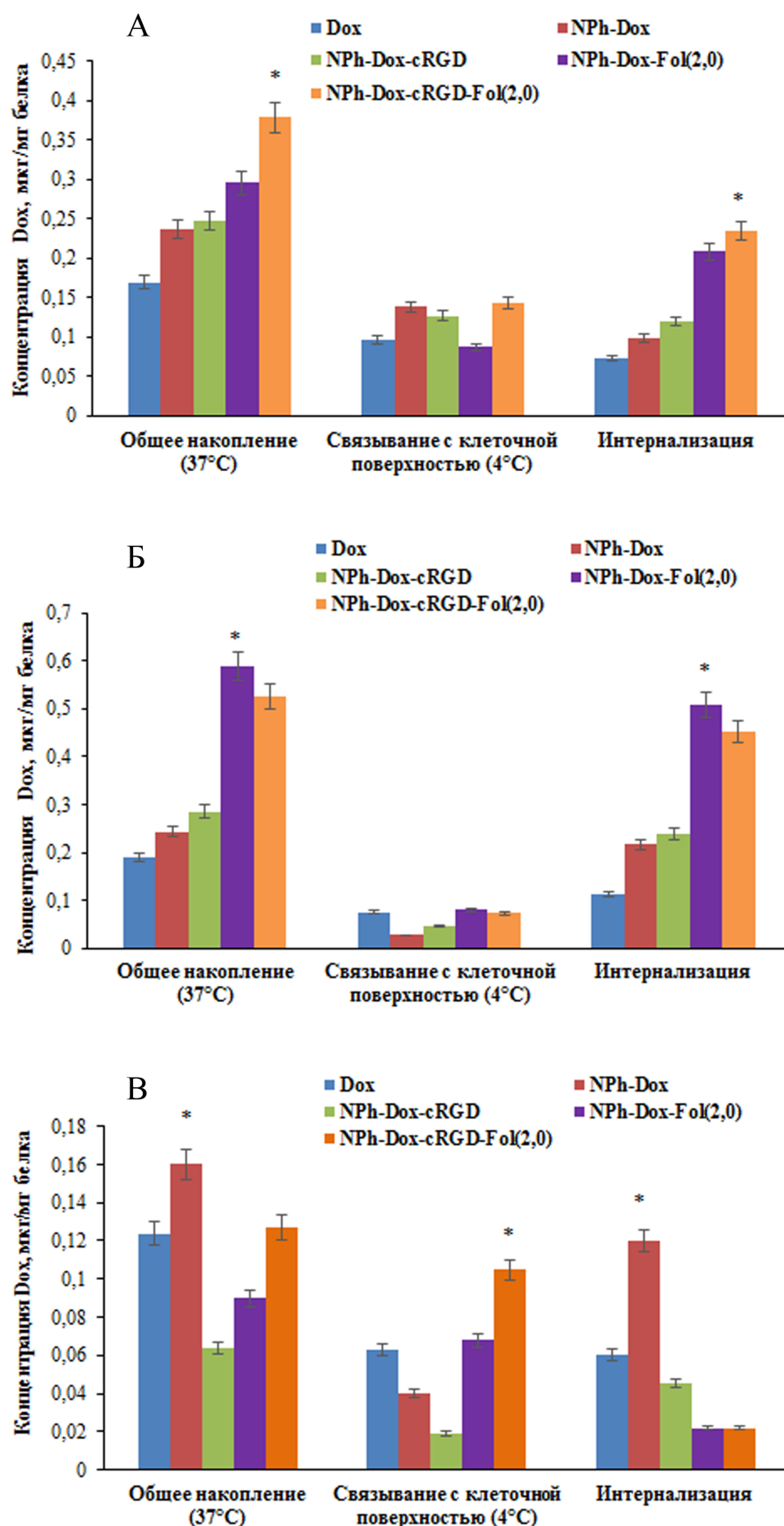


Рисунок 3. Накопление Dox в культуре клеток MDA-MB-231 (А), MCF-7 (Б) и Wi-38 (В) через 24 ч инкубации с композициями и субстанцией Dox (концентрация по Dox 10 мкг/мл). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3). * $p < 0,05$ по сравнению со свободной субстанцией (Dox).

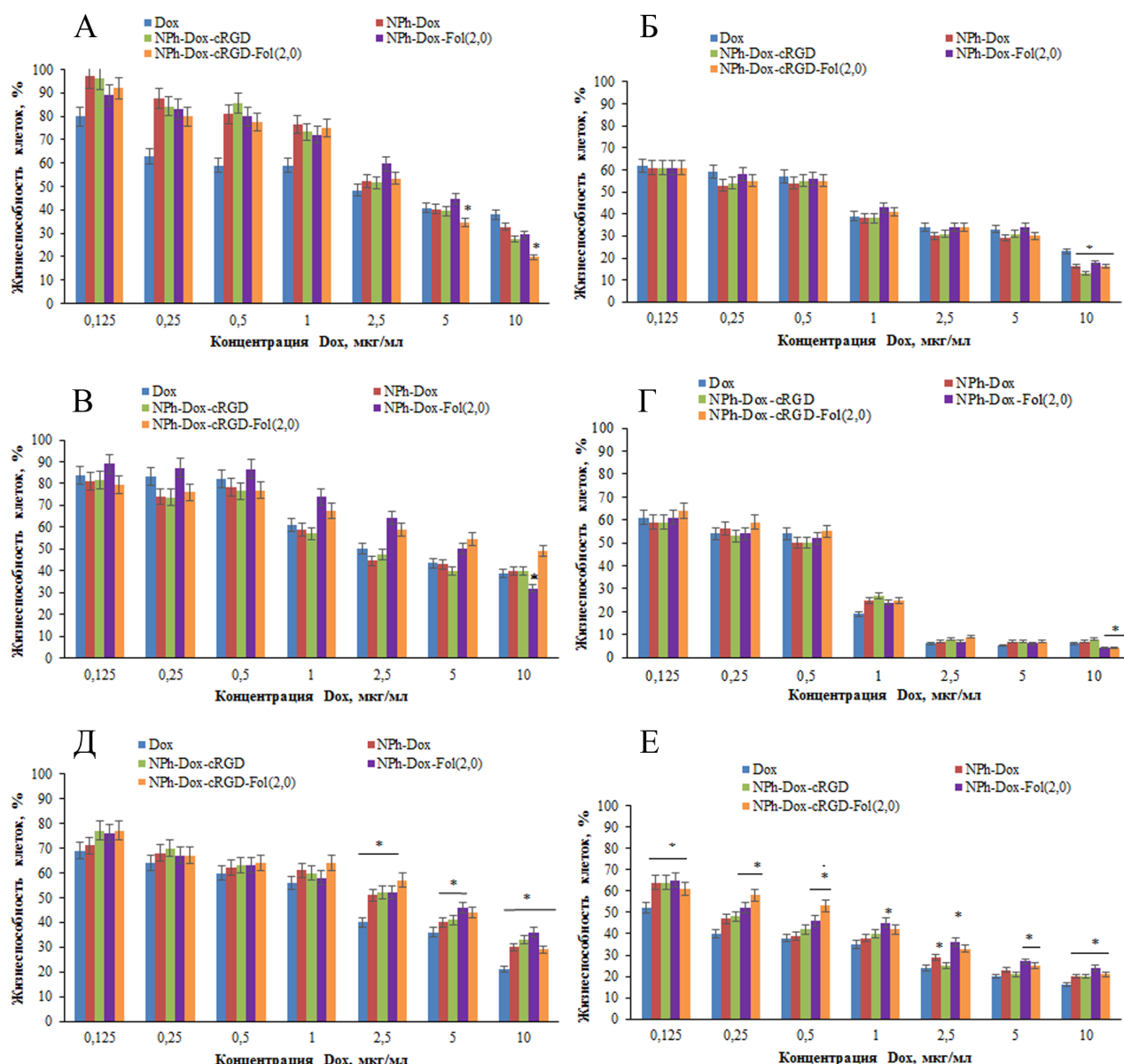


Рисунок 4. Жизнеспособность клеток MDA-MB-231 (А, Б), MCF-7 (В, Г) и Wi-38 (Д, Е) после инкубации в течение 24 ч (А, В, Д) и 48 ч (Б, Г, Е) с композициями и субстанцией Dox в различных концентрациях. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n=3$). * $p<0,05$ по сравнению со свободной субстанцией (Dox).

негативное влияние за счёт большей способности связываться с рецептором. Однако полученные данные свидетельствуют о том, что моновекторная композиция с cRGD-пептидом оказывала в равной степени влияние, как и фосфолипидная форма Dox (NPh-Dox), а композиция с двумя векторами, обладала меньшим цитотоксическим действием, чем моновекторная. Исследование цитотоксичности после 48 ч инкубации (рис. 4Е) показало, что композиции со встроенным Dox в НЧ проявляли меньшее токсическое действие на клетки Wi-38 по сравнению со свободной субстанцией.

В наших предыдущих исследованиях пути гибели опухолевых клеток [35] было показано, что наиболее подходящей для исследования апоптоза/некроза клеток была концентрация Dox 0,5 мкг/мл,

поэтому данную серию экспериментов проводили с использованием указанной концентрации лекарства. Результаты исследования механизма гибели клеток MDA-MB-231 (А), MCF-7 (Б), Wi-38 (В) представлены на рисунке 5.

Исследование на линии клеток MDA-MB-231 (рис. 5А) показало, что существенных различий между образцами не наблюдалось. Однако для образца с cRGD пептидом (NPh-Dox-cRGD) была показана гибель клеток в меньшей степени, и гибель их происходила по пути апоптоза (фиксировалось 5,14% клеток, подверженных раннему апоптозу). Для линии клеток MCF-7 (рис. 5Б) для всех образцов наблюдалась большая часть клеток, подверженных некрозу. Меньший процент гибели клеток по пути некроза был зафиксирован для образцов

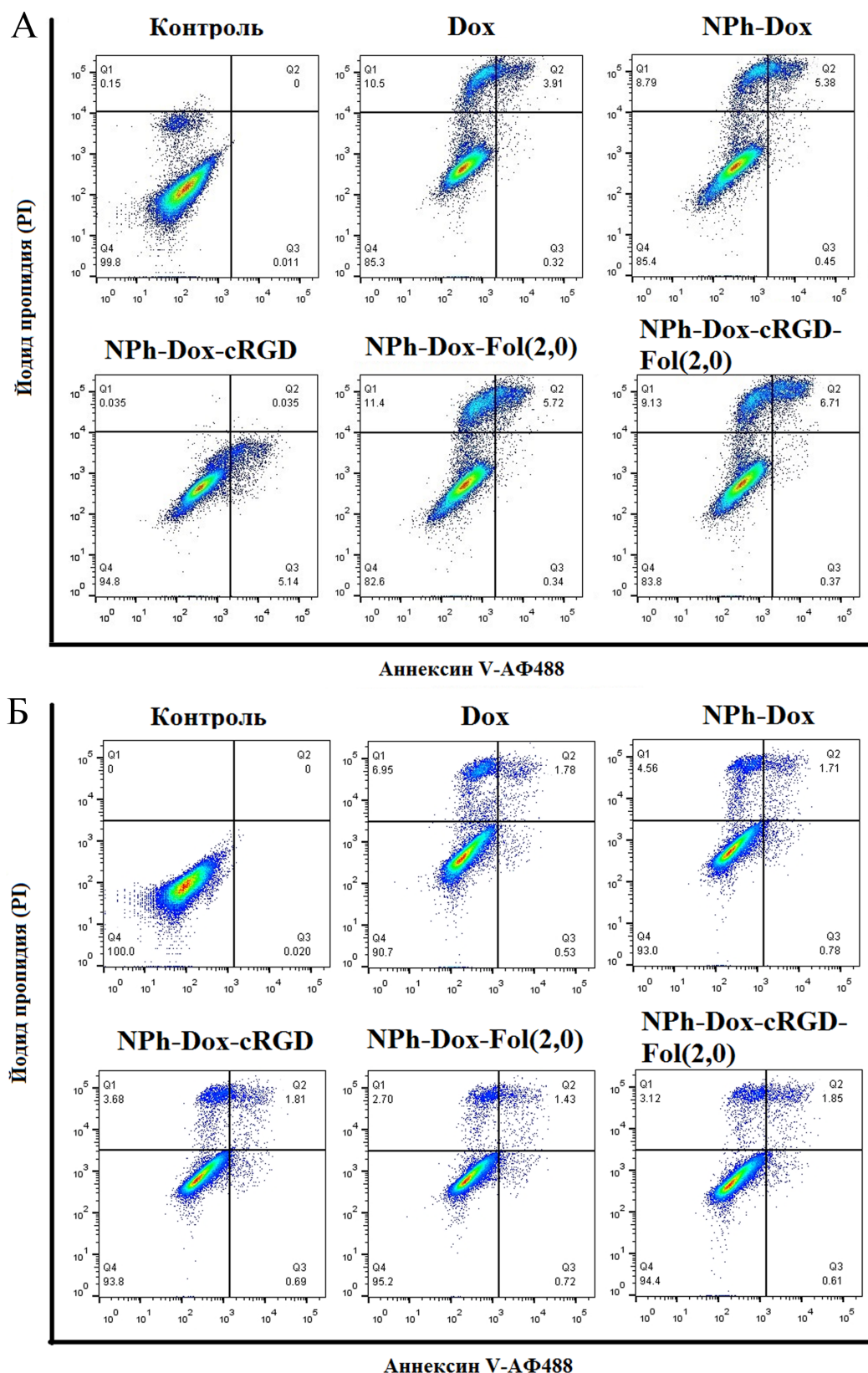


Рисунок 5. Анализ апоптоза в культурах клеток MDA-MB-231 (А), MCF-7 (Б), Wi-38 (В), инкубированных со свободным доксорубицином (Dox); встроенным в фосфолипидные НЧ (NPh-Dox); фосфолипидной композицией с адресным пептидом (NPh-Dox-cRGD); фосфолипидными композициями с фолиевой кислотой (NPh-Dox-Fol(2,0)); фосфолипидной композицией с двумя векторами (NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)). Концентрация по Dox была 0,5 мкг/мл. Дизайн квадранта: верхний левый (Q1): некроз, клетки окрашены PI; верху справа (Q2): поздний апоптоз; внизу справа (Q3): ранний апоптоз, клетки окрашены аннексином V; внизу слева (Q4): флуоресцентный сигнал на уровне аутофлуоресценции неокрашенных клеток.

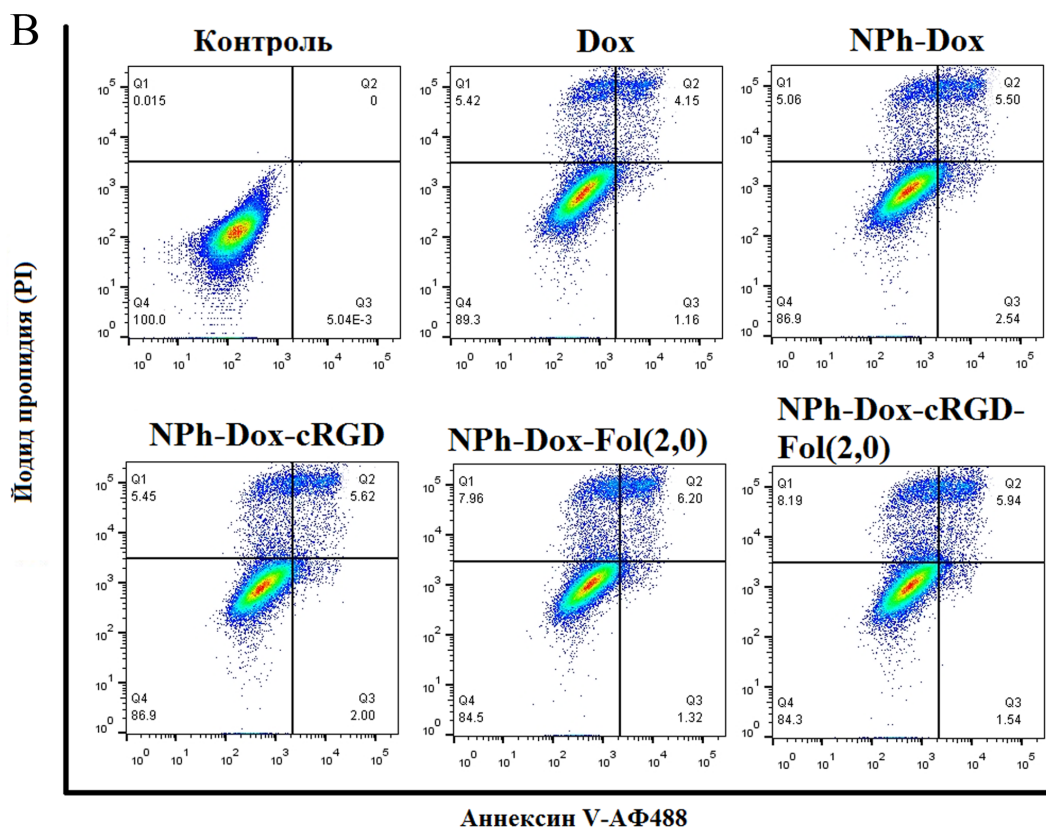


Рисунок 5. (продолжение)

NPh-Dox-Fol(2,0). На клетках фибробластов человека Wi-38 (рис. 5B) наблюдали гибель клеток по пути апоптоза (поздний апоптоз) и некроза практически в равной степени. Также стоит отметить, что на данной линии наблюдался небольшой процент клеток, подверженных раннему апоптозу (1–2,5%), по сравнению с остальными исследуемыми линиями.

Следующим этапом исследований была оценка возможного изменения клеточного цикла на линиях MDA-MB-231, MCF-7 и Wi-38 после инкубирования с исследуемыми Dox-содержащими образцами в течение 24 ч. Основным механизмом проявления противоопухолевого действия Dox является его способность встраиваться в ДНК и вызывать её повреждение [35]. При лечении Dox опухолей происходит повреждение ДНК клеток, что в разной степени приводит к клеточному старению или временной остановке клеточного цикла [36]. Поэтому важно было оценить степень влияния встраивания Dox в содержащую адресные молекулы фосфолипидную систему на изменение механизма действия лекарства в опухолевых клетках *in vitro*.

Исследование клеточного цикла на клеточной линии MDA-MB-231 (рис. 6A) показало, что в фазе G0/G1 наблюдалось небольшое увеличение числа клеток по сравнению с контролем для композиции NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0). Для образцов NPh-Dox и NPh-Dox-Fol(2,0), наоборот, процент клеток снижался (57–62%) в фазе G0/G1. Кроме того,

для образцов Dox, встроенного в фосфолипидные НЧ с/без добавления адресных фрагментов, наблюдалось удвоение пика в фазе G0/G1, характеризующей гибель клеток по пути апоптоза. В фазе sub G0/G1 наблюдалось максимальное повышение процента клеток при их инкубации с образцами NPh-Dox и NPh-Dox-Fol(2,0). В фазе S повышался процент клеток для фосфолипидной композиции (NPh-Dox), с адресным пептидом (NPh-Dox-cRGD) и с фолиевой кислотой (NPh-Dox-Fol(2,0)), при этом данный показатель не превышал 11%. В фазе G2/M увеличивался процент для свободной субстанции и композиции NPh-Dox-Fol(2,0). В то время как для NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0) наблюдалось снижение количества клеток в данной фазе.

Исследование клеточного цикла на второй клеточной линии рака молочной железы MCF-7 (рис. 6B) показало, что в фазе G0/G1 различий между образцами и контролем не наблюдалось. Изменения (повышение % клеток) наблюдались в фазе sub G0/G1, причем наибольшие значения отмечены для образцов фосфолипидной наноформы и с фолиевой кислотой (NPh-Dox-Fol(2,0)). Для образцов Dox, содержащих фолиевую кислоту (NPh-Dox-Fol(2,0) и NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)), клетки в фазе S не были выявлены. Также следует отметить снижение процент клеток в фазе G2/M для фосфолипидной наноконструкции (NPh-Dox). Исследование на данной линии косвенно показывают, что при обработке клеток NPh-Dox и NPh-Dox-Fol(2,0) происходит их гибель по пути апоптоза.

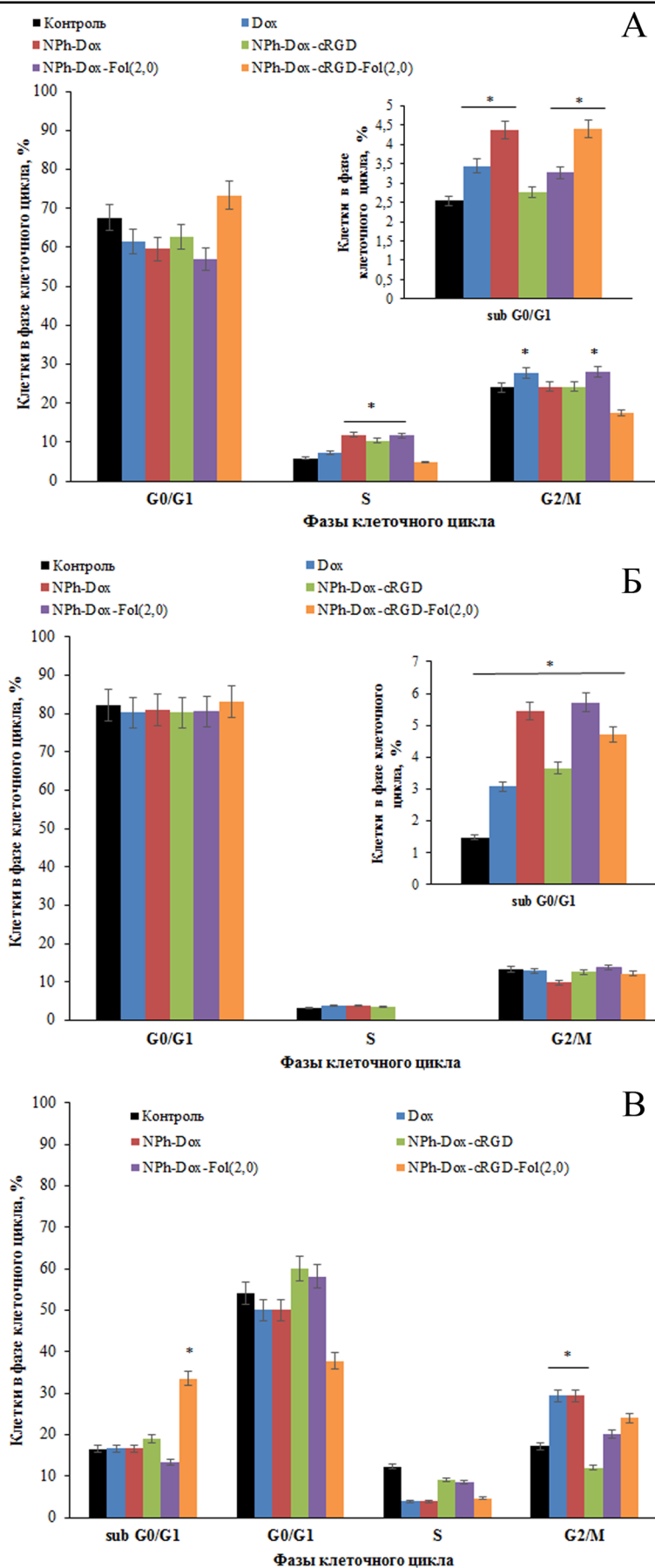


Рисунок 6. Графическое изображение влияния различных наноформ Dox на распределение клеток по клеточному циклу MDA-MB-231 (А), MCF-7 (Б) и Wi-38 (В). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

На нормальных клетках (Wi-38) (рис. 6B) было показано повышение процента клеток в фазе G2/M. Наибольшее значение было показано для свободного Dox, NPh-Dox и немного меньше для двухвекторной композиции NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0). Для этих же образцов было отмечено снижение количества клеток в фазе G0/G1, причём наибольшее снижение было выявлено в случае NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0). В фазе G0/G1 отмечено увеличение процента клеток для NPh-Dox-cRGD. В фазе sub G0/G1 наибольшее количество клеток представлено для двухвекторной композиции NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0), косвенно указывающей на гибель клеток по пути апоптоза, так как в данной фазе происходит удвоение ДНК (фрагментация ядра).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для повышения эффективности действия лекарств одним из подходов является использование нескольких адресных векторов для доставки лекарств к опухоли [18]. При использовании линкера одинаковой длины для каждого адресного вектора ((DSPE-PEG2000-cRGD и DSPE-PEG2000-Folat) наблюдалось увеличение размера частиц; при этом размер НЧ для исследуемой в данной работе композиции оставался в пределах 50 нм. ВЭЖХ исследования полученных композиций Dox с адресными конъюгатами показали практически полное встраивание лекарства в НЧ (99%).

Исследование клеточного накопления на линии MDA-MB-231 (экспрессия FR (+), интегрин $\alpha_v\beta_3$ (+)) показало повышение как общего накопления, так и интернализации Dox при включении его в НЧ. Максимальное общее накопление было отмечено для двухвекторной композиции (NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)). Максимальное накопление Dox на линии клеток рака молочной железы MCF-7 (FR (+), интегрин $\alpha_v\beta_3$ (-)) наблюдалось для композиции NPh-Dox-Fol(2,0); полученные значения превышали значение для фосфолипидной формы в 2,4 раза. На линии Wi-38 (экспрессия фолатного рецептора (-), интегрин $\alpha_v\beta_3$ (+)) наблюдалось повышение общего накопления и интернализации Dox при инкубации с фосфолипидной композицией (NPh-Dox).

На всех исследуемых линиях клеток разрабатываемые композиции оказывали дозозависимый цитотоксический эффект. При этом, цитотоксическое действие Dox-содержащих фосфолипидных композиций на клеточной линии Wi-38 проявлялось в меньшей степени, чем для свободной субстанции Dox, особенно в концентрациях более 1 мкг/мл. Встраивание Dox в фосфолипидные НЧ несколько уменьшало его токсичность по отношению к здоровым клеткам.

Исследование пути клеточной гибели на клеточной линии MDA-MB-231 показало в большей степени гибель по пути апоптоза (поздний апоптоз), а на MCF-7 — по пути некроза. Данный эффект, возможно, связан с особенностями используемых клеток и продолжительностью инкубации.

Оценка изменения клеточного цикла на клеточной линии MDA-MB-231 показала небольшое увеличение числа клеток в фазе G0/G1 по сравнению с контролем для композиции NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0), и, наоборот, снижение для NPh-Dox и композиции NPh-Dox-Fol(2,0). Пик фазы sub G0/G1 предшествует пику фазы G0/G1, отражая количество апоптотических клеток. В данной фазе наблюдалось снижение процента клеток для образцов NPh-Dox и NPh-Dox-Fol(2,0). На клеточной линии MCF-7 при исследовании клеточного цикла различий между образцами и контролем не наблюдалось в фазе G0/G1, при этом для фосфолипидной наноформы и образца с фолевой кислотой (NPh-Dox-Fol(2,0)) отмечено повышение количества клеток, находящихся в фазе sub G0/G1. На клетках Wi-38 было показано повышение процента клеток в фазе G2/M и понижение их количества в фазе G0/G1, особенно для свободного Dox, NPh-Dox и двухвекторной композиции (NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)). В фазе sub G0/G1 наибольшее количество клеток наблюдалось при инкубации с двухвекторной композицией (NPh-Dox-cRGD-Fol(2,0)).

Таким образом, проведённое исследование *in vitro* показало перспективность использования двух векторов с одинаковой длиной линкеров для встраивания в НЧ для фосфолипидной системы доставки лекарств.

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

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. (2024) Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году, Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 262 с. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. (2024) The state of oncological care for the population of Russia in 2023; P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, pp. 262.]
2. Marshall S.K., Angsantikul P., Pang Z., Nasongkla N., Hussien R.S.D., Thamphiwatana S.D. (2022) Biomimetic targeted theranostic nanoparticles for breast cancer treatment. *Molecules*, 27(19), 6473. DOI: 10.3390/molecules27196473

3. Nicoletto R.E., Ofner C.M. 3rd (2022) Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **89**(3), 285–311. DOI: 10.1007/s00280-022-04400-y
4. Sheibani M., Azizi Y., Shayan M., Nezamoleslami S., Eslami F., Farjoo M.H., Dehpour A.R. (2022) Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview on pre-clinical therapeutic approaches. *Cardiovasc. Toxicol.*, **22**(4), 292–310. DOI: 10.1007/s12012-022-09721-1
5. Kong C.-Y., Guo Z., Song P., Zhang X., Yuan Y.-P., Teng T., Yan L., Tang Q.-Z. (2022) Underlying the mechanisms of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity: oxidative stress and cell death. *Int. J. Biol. Sci.*, **18**(2), 760–770. DOI: 10.7150/ijbs.65258
6. Qin L., Wu L., Jiang S., Yang D., He H., Zhang F., Zhang P. (2018) Multifunctional micelle delivery system for overcoming resistance of doxorubicin. *J. Drug Target.*, **26**(4), 289–295. DOI: 10.1080/1061186X.2017.1379525
7. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I. (2009) Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr. Med. Chem.*, **16**(25), 3267–3285. DOI: 10.2174/092986709788803312
8. Ansari L., Shiehzhadeh F., Taherzadeh Z., Nikoofal-Sahlabadi S., Momtazi-Borojeni A.A., Sahebkar A., Eslami S. (2017) The most prevalent side effects of pegylated liposomal doxorubicin monotherapy in women with metastatic breast cancer: a systematic review of clinical trials. *Cancer Gene Ther.*, **24**(5), 189–193. DOI: 10.1038/cgt.2017.9
9. Prados J., Melguizo C., Ortiz R., Vélez C., Alvarez P.J., Arias J.L., Ruiz M.A., Gallardo V., Aranega A. (2012) Doxorubicin-loaded nanoparticles: new advances in breast cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **12**(9), 1058–1070. DOI: 10.2174/187152012803529646
10. Zitzmann S., Ehemann V., Schwab M. (2002) Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells *in vivo*. *Cancer Res.*, **62**(18), 5139–5143.
11. Tsai C.-C., Yang Y.-C.S.H., Chen Y.-F., Huang L.-Y., Yang Y.-N., Lee S.-Y., Wang W.-L., Lee H.-L., Whang-Peng J., Lin H.-Y., Wang K. (2023) Integrins and actions of androgen in breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(17), 2126. DOI: 10.3390/ijms24172126
12. Lan K.-C., Wei K.-T., Lin P.-W., Lin C.-C., Won P.-L., Liu Y.-F., Chen Y.-J., Cheng B.-H., Chu T.M.-G., Chen J.-F., Huang K.-E., Chang C., Kang H.-Y. (2022) Targeted activation of androgen receptor signaling in the periosteum improves bone fracture repair. *Cell Death Dis.*, **13**(2), 123. DOI: 10.1038/s41419-022-04595-1
13. Bogdanowich-Knipp S.J., Jois D.S.S., Siahaan T.J. (1999) The effect of conformation on the solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J. Pept. Res.*, **53**(5), 523–529. DOI: 10.1034/j.1399-3011.1999.00055.x
14. Bogdanowich-Knipp S.J., Chakrabarti S., Williams T.D., Dillman R.K., Siahaan T.J. (1999) Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J. Pept. Res.*, **53**(5), 530–541. DOI: 10.1034/j.1399-3011.1999.00052.x
15. Jiang Y., Wang C., Zhang M., Liu L., Gao X., Zhang S., Ye D. (2023) Study of folate-based carbon nanotube drug delivery systems targeted to folate receptor α by molecular dynamic simulations. *Int. J. Biol. Macromol.*, **244**, 125386. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125386
16. Zwick G.L., Mansoori G.A., Jeffery C.J. (2012) Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Rev.*, **3**, 18496. DOI: 10.3402/nano.v3i0.18496
17. Mansoori G.A., Brandenburg K.S., Shakeri-Zadeh A. (2010) A comparative study of two folate-conjugated gold nanoparticles for cancer nanotechnology applications. *Cancers*, **2**(4), 1911–1928. DOI: 10.3390/cancers2041911
18. Luo W., Wen G., Yang L., Tang J., Wang J., Wang J., Zhang S., Zhang L., Ma F., Xiao L., Wang Y., Li Y. (2017) Dual-targeted and pH-sensitive doxorubicin prodrug-microbubble complex with ultrasound for tumor treatment. *Theranostics*, **7**(2), 452–465. DOI: 10.7150/thno.16677
19. Терешкина Ю.А., Бедретдинов Ф.Н., Кострюкова Л.В. (2023) Двухвекторная транспортная фосфолипидная наносистема доксорубина: накопление в клетках рака молочной железы *in vitro*. *Биомедицинская химия*, **69**(6), 409–419. [Tereshkina Yu.A., Bedretdinov F.N., Kostryukova L.V. (2023) Two-vector transport phospholipid nanosystem of doxorubicin: accumulation in breast cancer cells *in vitro*. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(6), 409–419.] DOI: 10.18097/PBMC20236906409
20. 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. Nanomedicine*, **12**, 1941–1958. DOI: 10.2147/IJN.S125573
21. Xu B., Yuan L., Hu Y., Xu Z., Qin J.-J., Cheng X.-D. (2021) Synthesis, characterization, cellular uptake, and *in vitro* anticancer activity of fullerene-doxorubicin conjugates. *Front. Pharmacol.*, **11**, 598155. DOI: 10.3389/fphar.2020.598155
22. Sheldon K., Liu D., Ferguson J., Gariepy J. (1995) Oligomers: design of *de novo* peptide-based intracellular vehicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(6), 2056–2060. DOI: 10.1073/pnas.92.6.2056
23. Wan D., Liu Y., Guo X., Zhang J., Pan J. (2022) Intelligent drug delivery by peptide-based dual-function micelles. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(17), 9698. DOI: 10.3390/ijms23179698
24. Dinakar Y.H., Karole A., Parvez S., Jain V., Mudavath S.L. (2023) Folate receptor targeted NIR cleavable liposomal delivery system augment penetration and therapeutic efficacy in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1867**(9), 130396. DOI: 10.1016/j.bbagen.2023.130396
25. 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
26. Danaei M., Dehghankhold M., Ataei S., Hasanzadeh Davarani F., Javanmard R., Dokhani A., Khorasani S., Mozafari M.R. (2018) Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, **10**(2), 57. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057
27. 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
28. 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/nnm.13.212
29. 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. *Mol. Pharm.*, **17**(1), 349–358. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01134
30. 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.e2. DOI: 10.1016/j.jvir.2020.05.010

31. Godugu K., Sudha T., Davis P.J., Mousa S.A. (2021) Nano diaminopropane tetrac and integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in different cancer types: anti-cancer efficacy and safety. *Cancer Treat. Res. Commun.*, **28**, 100395. DOI: 10.1016/j.ctarc.2021.100395
32. Zagami R., Rapozzi V., Piperno A., Scala A., Triolo C., Trapani M., Xodo L.E., Monsù Scolaro L., Mazzaglia A. (2019) Folate-decorated amphiphilic cyclodextrins as cell-targeted nanophototherapeutics. *Biomacromolecules*, **20**(7), 2530–2544. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00306
33. 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
34. 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
35. Kostryukova L.V., Tereshkina Y.A., Tikhonova E.G., Khudoklinova Y.Y., Bobrova D.V., Gisina A.M., Morozovich G.E., Pronina V.V., Bulko T.V., Shumyantseva V.V. (2023) Effect of an NGR peptide on the efficacy of the doxorubicin phospholipid delivery system. *Nanomaterials*, **13**(4), 2229. DOI: 10.3390/nano13152229
36. Rivankar S. (2014) An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.*, **10**(4), 853–858. DOI: 10.4103/0973-1482.139267
37. Feng X., Wu C., Yang W., Wu J., Wang P. (2022) Mechanism-based sonodynamic-chemo combinations against triple-negative breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(14), 7981. DOI: 10.3390/ijms23147981

Поступила в редакцию: 20. 11. 2024.
После доработки: 10. 12. 2024.
Принята к печати: 11. 12. 2024.

THE EFFECT OF ADDITION OF TWO TARGETED VECTORS, cRGD PEPTIDE AND FOLIC ACID, WITH THE SAME LINKER LENGTH ON THE PROPERTIES OF THE DOXORUBICIN PHOSPHOLIPID COMPOSITION: A STUDY OF PROPERTIES *IN VITRO*

L.V. Kostryukova, Yu.A. Tereshkina, F.N. Bedretidinov, A.M. Gisina*

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

Serious side effects of the chemotherapeutic drug doxorubicin prompt researchers to develop systems for its targeted delivery to cells. In this work, we continued the study on the effect of using two vectors in a phospholipid delivery system of doxorubicin (Dox) for targeted therapy of breast cancer. We have obtained a composition NPh-Dox-cRGD-Fol(2.0) with the same linker length for both targeting ligands, cRGD and folic acid (PEG 2000). The resulting composition NPh-Dox-cRGD-Fol(2.0) with a particle size less than 50 nm and with 99% Dox incorporated into nanoparticles in an experiment on drug release at different pH values (5.0 and 7.4) showed a faster release and a high level of Dox compared to the phospholipid nanoform and a composition containing only the cRGD peptide. *In vitro* experiments on MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the folate receptor and integrin $\alpha_v\beta_3$ demonstrated an increase in the total accumulation and internalization of Dox upon incubation with the dual-vector composition compared to the control samples. On the MCF-7 breast cancer cell line (expressing only the folate receptor), a similar effect was observed upon incubation with the single-vector composition containing folic acid (NPh-Dox-Fol(2.0)). In experiments with normal Wi-38 cell line, the internalization and total accumulation of the drug were comparable for both the free substance and the vector compositions. After 24 h incubation of MDA-MB-231 cells with Dox-containing (10 $\mu\text{g/ml}$ Dox) samples, the lowest percentage of living cells was observed for the studied dual-vector composition NPh-Dox-cRGD-Fol(2.0). On MCF-7 cells, the cytotoxic effect was manifested equally for the studied samples. The study of the cell death pathway on MDA-MB-231 cells showed the predominance of the apoptotic pathway (late apoptosis), while in the case of MCF-7 the necrosis pathway predominated. The cell cycle study performed using MDA-MB-231 cells (folate receptor (+) and integrin $\alpha_v\beta_3$ (+)) revealed an increase in the percentage of cells in the G0/G1 phase was noted thus indicating apoptotic cell death during incubation with NPh-Dox-cRGD-Fol(2.0). No differences were found between the samples in experiments performed on MCF-7 cells (folate receptor (+) and integrin $\alpha_v\beta_3$ (-)).

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

Keywords: doxorubicin; phospholipid nanoparticles; breast cancer; cRGD peptide; folic acid; FR α

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

Received: 20.11.2024; revised: 10.12.2024; accepted: 11.12.2024.