

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ ПРИСОЕДИНЕНИЯ cRGD ПЕПТИДА К ФОСФОЛИПИДНЫМ НАНОЧАСТИЦАМ С ВКЛЮЧЕННЫМ ДОКСОРУБИЦИНОМ НА АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ *IN VITRO*

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

Научно-исследовательский институт Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: kostryukova87@gmail.com

Одним из методов лечения глиобластомы после хирургического вмешательства является химиотерапия. Используемые при этом препараты ввиду их неспецифического распределения приводят к ряду осложнений. Одним из способов преодоления данного недостатка является снабжение лекарств системами доставки с адресными молекулами. Это способствует накоплению терапевтических агентов непосредственно в очаге поражения и минимизирует побочные проявления. В данной работе исследовали влияние фосфолипидной композиции доксорубина с адресным cRGD пептидом (NPh-Dox-cRGD), который селективно взаимодействует с интегрином $\alpha_v\beta_3$ на поверхности ряда опухолевых клеток, включая клетки глиобластомы. Сравнительная оценка цитотоксического действия свободной субстанции (Dox), композиции NPh-Dox-cRGD и Dox, встроенной в фосфолипидные наночастицы без адресного лиганда (NPh-Dox), показала, что при встраивании в фосфолипидные наночастицы Dox проявляет цитотоксическое действие в меньшей степени. Через 24 ч инкубации клеток U-87 MG с веществами в максимальной концентрации по Dox (30 мкг/мл) процент живых клеток составлял для Dox – 6%, для NPh-Dox-cRGD – 21% и для NPh-Dox – 17%. На контрольной клеточной линии HeLa статистически значимых различий отмечено не было. Оценка гибели опухолевых клеток с помощью метода проточной цитометрии указывала на то, что большая часть клеток погибала по пути апоптоза. При инкубации с композицией, содержащей адресный пептид, NPh-Dox-cRGD, в концентрации (по Dox) 0.5 мкг/мл процент клеток, подверженных позднему апоптозу, составлял 29.7%, для свободной формы – 24.4%. Оценка клеток, подверженных раннему апоптозу (концентрация по Dox 0.5 мкг/мл) показала, что процент данных клеток для образца с пептидом был выше и составлял 11.4%.

Ключевые слова: глиобластома; фосфолипидные наночастицы; cRGD; интегрин $\alpha_v\beta_3$; доксорубин; апоптоз

DOI: 10.18097/BMCRM00204

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома (ГБМ) – одна из распространенных и смертельно опасных первичных опухолей головного мозга. В настоящее время основным лечением ГБМ является хирургическая резекция в сочетании с лучевой терапией и химиотерапией [1]. Гетерогенность опухоли, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), стволовые клетки глиомы и механизмы восстановления повреждений ДНК препятствуют эффективному лечению ГБМ [2]. Кроме того, клетки опухоли головного мозга также экспрессируют транспортный белок для оттока лекарств. Из-за этих барьеров в опухолях головного мозга свободным лекарствам, как правило, трудно обеспечить необходимое нацеливание и подходящую доставку для проникновения в паренхиму глиомы. Все это приводит к плохой терапевтической реакции на опухоль и серьезному побочному действию на здоровые ткани [3]. Другой проблемой терапии глиом является ограниченный набор высокоэффективных и малотоксичных химиотерапевтических препаратов, а также их резистентность к опухоли [4].

Доксорубин (Dox) является антибиотиком антрациклинового ряда, широко применяемым химиотерапевтическим препаратом для лечения различных опухолей (острый лейкоз, ГБМ, рак молочной железы, болезнь Ходжкина, саркома и т.д.) [5-9]. Его противоопухолевая активность связана с ингибированием топоизомеразы II, предотвращающей разворачивание и

разделение цепи при репликации ДНК, а также ее репарацию. Данный процесс приводит к гибели клеток, называемой апоптозом. Другими механизмами, которые могут быть задействованы при проявлении терапевтического действия Dox, являются интеркалирование в ДНК и/или образование цитотоксических свободных радикалов кислорода с последующим ингибированием синтеза и функции ДНК [10]. Терапия рака с использованием Dox имеет значительные ограничения, связанные с его токсичностью по отношению к здоровым тканям. Это приводит к поражению сердца, мозга, печени и почек, и последствия этой токсичности могут проявляться через большой промежуток времени [11].

Появление диагностических и терапевтических подходов в онкологической медицине на основе нанотехнологий предоставляет новые и многообещающие инструменты, которые позволят повысить эффективность лекарств, в частности химиопрепаратов, за счет разработки систем их адресной доставки в ткани-мишени. Адресную доставку к ГБМ можно обеспечить, используя лиганды к белкам, сверхэкспрессируемым в самой опухоли или окружающих ее сосудах (например, интегринам α_v) [12]. Эти адресные агенты за счет высокого сродства к своим мишеням доставляют конъюгированные с ними лекарственные вещества конкретно к опухолевым клеткам и сосудистой сети опухолей [13]. В качестве адресных фрагментов используют различные группы: пептиды, антитела, аптамеры и малые молекулы [14, 15]. Снабжение транспортных систем (наночастиц, липосом, везикул) такими



адресными лигандами представляет большой интерес [16]. За счет нацеливания циклического cRGD-пептида на интегрин $\alpha_v\beta_3$, уровень которого существенно повышен на поверхности клеток различных типов злокачественных опухолей, таких как меланома, ГБМ, рак мочевого пузыря и поджелудочной железы, данный пептид можно считать уникальным молекулярным лигандом для таргетной химиотерапии рака [17-19]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* обнаружено усиление противоопухолевого действия наночастиц (НЧ), модифицированных cRGD-пептидом, по сравнению с нецелевым аналогом [20-24].

Ранее нами была разработана фосфолипидная композиция Dox с адресным cRGD-пептидом (NPh-Dox-cRGD) и показана ее эффективность по интернализации и общему накоплению Dox на клеточной линии ГБМ человека U-87 MG [25]. Целью настоящего исследования была оценка цитотоксического действия и пути гибели опухолевых клеток после инкубирования с разработанной фосфолипидной Dox-содержащей композицией с cRGD-пептидом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение композиций

Получение фосфолипидной композиции Dox с адресным циклическим пептидом (cRGD) (NPh-Dox-cRGD) и без него (NPh-Dox) проводили согласно методике [25], используя соевый фосфатидилхолин Lipoid S100 ("Lipoid", Германия), доксорубин гидрохлорид ("Омутнинская научная опытно-промышленная база", Россия), а также пептид cRGDfC ("Синтон-Лаб", Россия), DSPE-Peg2000-Mal ("Avanti", США). Массовое соотношение основных компонентов Lipoid S100:cRGD:Dox составляло 20:1:1.

Клеточные линии

Клеточные линии ГБМ U-87 MG и рака шейки матки HeLa были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и поддерживались в коллекции клеточных культур Института биомедицинской химии. Клетки U-87 MG культивировали в среде DMEM/F12 ("ПанЭко") с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови ("Cargilorn Scientific", Германия). Клетки HeLa культивировали в среде DMEM ("ПанЭко") с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови. Клетки U-87 MG и HeLa культивировали при 37°C в атмосфере с относительной влажностью 95 % и содержанием 5% CO₂ (CO₂-инкубатор "Sanyo", Япония). В работе использовали клеточные линии от 3 до 10 пассажей.

Цитотоксическое действие *in vitro*

Оценку цитотоксического действия разработанной фосфолипидной композиции Dox с пептидом (NPh-Dox-cRGD) проводили на линиях клеток U-87 MG и HeLa. В качестве препаратов сравнения использовали свободную субстанцию Dox и Dox, встроенный в НЧ (NPh-Dox).

Клетки U-87 MG и HeLa (15*10³ клеток на лунку) рассеивали в стерильные 96-луночные культуральные планшеты ("Biologix", Китай) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24-26 ч. После этого вносили

исследуемые вещества с различными концентрациями Dox: 0.025 мкг/мл, 0.05 мкг/мл, 2.5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 15 мкг/мл, 30 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 24 ч и 48 ч.

После инкубации осторожно добавляли по 100 мкл МТТ (1 мг/мл) в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Затем осторожно удаляли среду, добавляли 100 мкл DMSO ("ПанЭко") и инкубировали еще 15 мин на орбитальном шейкере ELMi S-3.02M.A20 ("ELMI Ltd.", Латвия). Поглощение регистрировали при 550 нм (Multiscan FC, "ThermoSpectronic", США) и нормировали на необработанный контроль (без Dox).

Жизнеспособность клеток рассчитывали по следующему уравнению (1):

Расчет IC₅₀ проводили онлайн с помощью сайта AAT Bioquest [26].

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

Анализ клеточного апоптоза

Апоптоз клеток, опосредованный Dox, NPh-Dox и NPh-Dox-NGR, оценивали с помощью метода проточной цитометрии и специального набора для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF488 ("Lumiprobe", Россия). Кратко, клетки U-87 MG высевали в 6-луночные планшеты (10⁶ клеток/лунка) и культивировали в течение 24 ч. После клетки инкубировали со свежей средой, содержащей Dox, NPh-Dox и NPh-Dox-NGR (0.5 мкг/мл и 5 мкг/мл по Dox) в течение 24 ч (37°C, 5% CO₂). Далее клетки дважды отмывали от среды и разводили раствором Версена с последующим суспендированием путем пипетирования. Далее клетки центрифугировали при 1200 об/мин на Centrifuge 5810R ("Eppendorf", Германия) в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера для связывания аннексина V, 1x ("Lumiprobe"). Клетки инкубировали с 5 мкл аннексина V-AF488 15 мин в темноте при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл буфера для связывания в каждую пробирку. После добавляли 5 мкл пропидий йодида (PI), аккуратно перемешивали содержимое пробирки и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте. Окрашивание клеток анализировали с помощью проточного цитометра FACSAria III ("BD Biosciences", США), оснащенного синим (488 нм) и желто-зеленым (561 нм) лазерами. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva версии 7. Графическое представление данных произведено с использованием FlowJo версии 10.

Статистическая обработка

Для оценки достоверности различий измеряемых параметров по трём-четырёх повторностям использовали критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. На рисунках данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе исследовали разработанную ранее композицию NPh-Dox-cRGD [25], содержащую аффинный

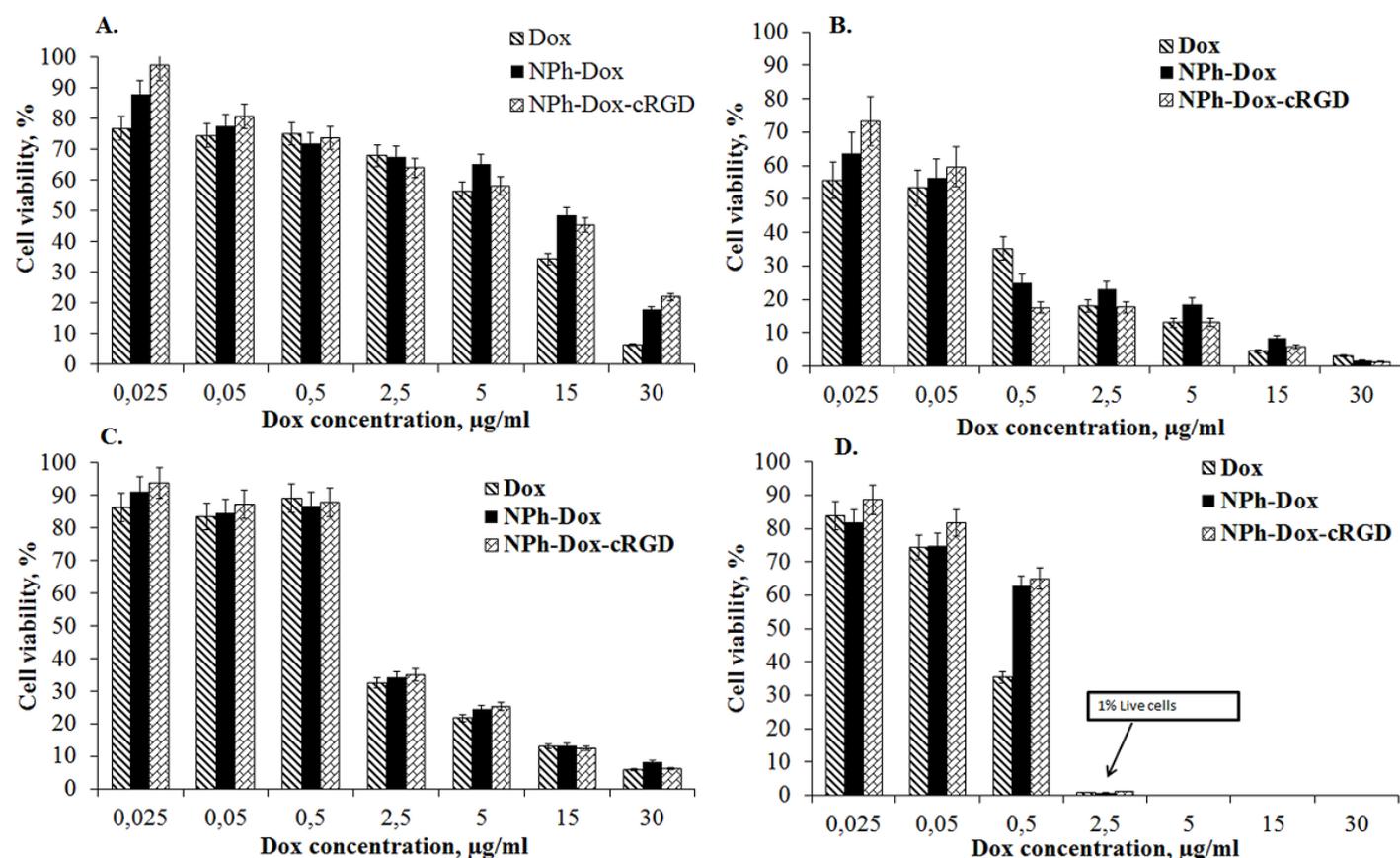


Рисунок 1. Жизнеспособность клеток U-87 MG (A, C) и HeLa (B, D), инкубированных со свободным Dox, Dox, встроенным в фосфолипидные НЧ (Nph-Dox) и Dox, встроенным в фосфолипидные НЧ с адресным пептидом (Nph-Dox-cRGD) в течение 24 ч (A, B) и 48 ч (C, D) в различных концентрациях. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=4).

к интегрину $\alpha_v\beta_3$ адресный циклический пептид cRGD [27]. На поверхности опухолевых клеток ГБМ выявлен достаточно высокий уровень интегрин $\alpha_v\beta_3$, позволяющий обеспечить повышенный захват зондов для доставки лекарств [18]. Ранее на клетках ГБМ U-87 MG нами было показано, что использование адресного пептида (cRGD) в составе фосфолипидной Dox-содержащей композиции повышало как общее накопление лекарства, так и его проникновение внутрь клетки [25]. Результаты сравнительной оценки цитотоксического действия Dox, встроенного в НЧ с адресным фрагментом (NPh-Dox-cRGD), свободной субстанции Dox и фосфолипидной композиции Dox без адресного пептида представлены на рисунке 1. В качестве контрольной линии использовали линию клеток HeLa, для которой указанный рецептор не характерен [28].

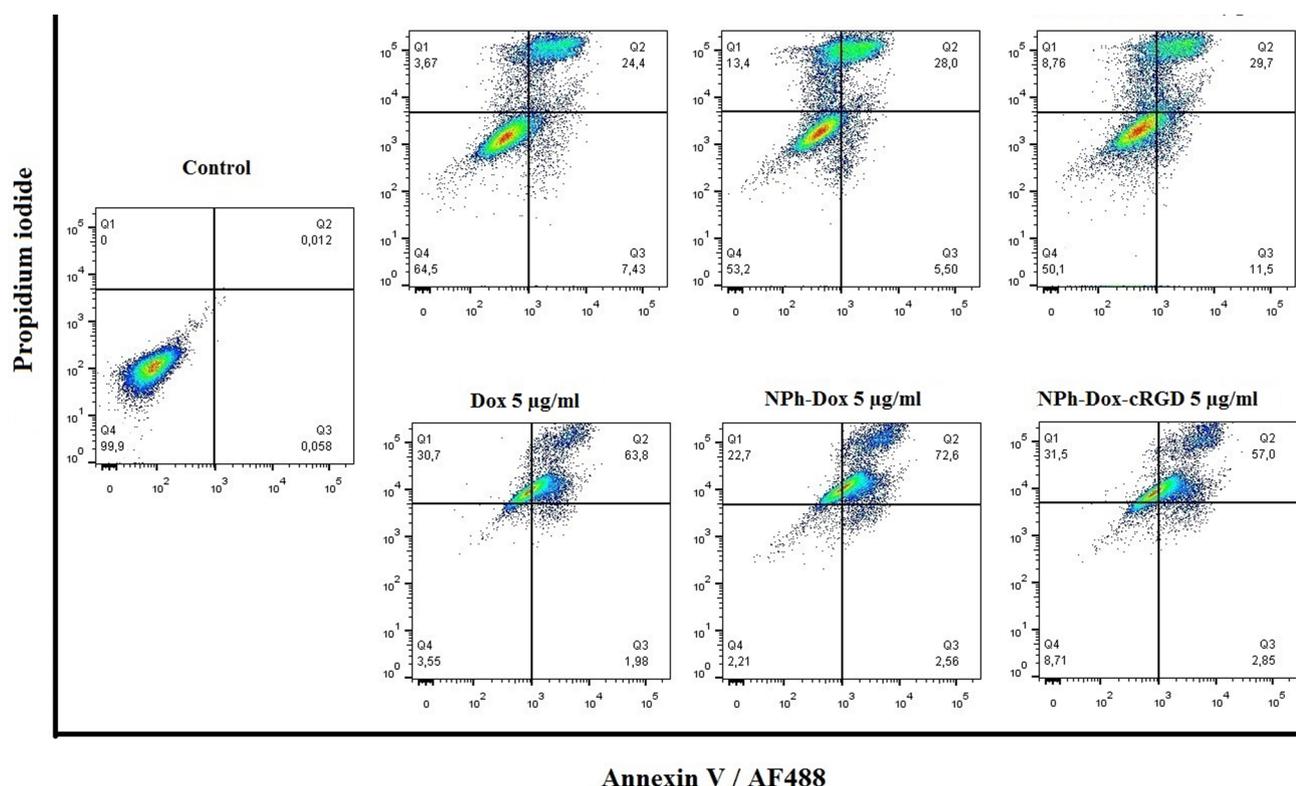
Во всех вариантах исследуемый показатель процента жизнеспособности клеток зависел от используемой дозы и от времени инкубации с веществами. После 24 ч инкубации клеток линии U-87 MG с исследуемыми веществами разница была отмечена при минимальной концентрации (0.025 мкг/мл). В варианте с адресным фрагментом процент живых клеток составлял 97%, с образцом фосфолипидной композиции – 88%, для свободной субстанции Dox – около 77%. Повышение концентрации Dox во всех образцах приводило к практически равному снижению процента живых клеток (разница между образцами была в пределах ошибки).

При концентрации 5 мкг/мл (по Dox) данный показатель для фосфолипидной композиции был выше остальных образцов на 7-8%. При 15 мкг/мл наблюдалось снижение

процента живых клеток в образце с Dox на 11% и 14% по сравнению с фосфолипидными образцами с адресным компонентом и без соответственно. В максимальной концентрации 30 мкг/мл (в пересчете на Dox) отмечено большее влияние фосфолипидных образцов независимо от наличия адресного пептида (для субстанции – 6%, для NPh-Dox-cRGD – 21%, для NPh-Dox – 17%), т.е. при встраивании Dox в фосфолипидные НЧ отмечено проявление его цитотоксического действия в меньшей степени.

На линии клеток HeLa, аналогично линии U-87 MG, с увеличением концентрации процент живых клеток уменьшался. При этом между образцами в каждой рассматриваемой концентрации (по Dox) достоверного различия отмечено не было. При сравнении двух указанных клеточных линий в максимальной концентрации действующего вещества получены одинаковые значения процента живых клеток, соответственно данная концентрация является наиболее токсичной для клеток, в том числе для фосфолипидных композиций, независимо от наличия cRGD.

Через 48 ч инкубации клеток U-87 MG с исследуемыми веществами был отмечен аналогичный дозозависимый эффект (рис. 1C). При минимальной концентрации (0.025 мкг/мл) была показана большая разница в значениях между образцами. Максимальное значение процента живых клеток отмечено в варианте с cRGD-пептидом (73%), что на 9% и 17% выше фосфолипидного образца и свободной субстанции соответственно. В максимальной концентрации (по Dox) различий для исследуемых образцов в цитотоксическом действии зафиксировано не было.



Annexin V / AF488

Рисунок 2. Анализ апоптоза в культуре клеток U-87 MG, инкубированной со свободным доксорубицином (Dox), Dox, встроенным в фосфолипидные НЧ (NPh-Dox), и фосфолипидной композиции с адресным пептидом (NPh-Dox-cRGD). Концентрация по Dox составляла 0.5 мкг/мл и 5 мкг/мл. Дизайн квадранта: верхний левый (Q1) – некроз, клетки окрашены пропидий йодидом; верху справа (Q2) – поздний апоптоз; внизу справа (Q3) – ранний апоптоз, клетки окрашены аннексином V; внизу слева (Q4) – флуоресцентный сигнал на уровне аутофлуоресценции неокрашенных клеток.

Через 48 ч инкубирования клеток HeLa с исследуемыми веществами (рис. 1Г) было показано, что концентрация по Dox, равная 2.5 мкг/мл и выше, приводила к полной гибели клеток. Достоверная разница получена для образцов фосфолипидных композиций с адресным пептидом и без (64% и 66% соответственно) по сравнению со свободной субстанцией, где значения процента живых клеток были практически в два раза ниже. При 0.025 мкг/мл и 0.05 мкг/мл жизнеспособность клеток была выше, однако, без достоверной разницы между образцами.

В таблице 1 приведены результаты по расчету IC_{50} , полученные для клеток U-87 MG через 24 ч инкубации с исследуемыми веществами.

Расчетные значения IC_{50} показали, что для фосфолипидной композиции данная концентрация была максимальна (20.78 мкг/мл) и превышала значения для свободной субстанции практически на 37%, а для композиции с адресным пептидом – на 19%. Таким образом, можно предположить, что фосфолипидная композиция Dox с адресным фрагментом обладает меньшей токсичностью по сравнению со свободной субстанцией, однако несколько большей, чем фосфолипидная композиция (NPh-Dox). В работе [29] авторы на основании собственных исследований пришли к выводу, что цитотоксическое действие свободного Dox обусловлено его способностью быстро диффундировать в цитоплазму, а затем в ядро клеток U87-MG, Dox интеркалировал ДНК, тем самым, предотвращая ее репликацию, при этом свободный Dox не обладал способностью избирательно воздействовать на опухоль *in vivo*, что может приводить к серьезным побочным эффектам.

Таблица 1. Расчетное значение IC_{50} , полученное на клеточной линии U-87 MG через 24 ч инкубации

| Образцы | IC_{50} мкг/мл |
|--------------|------------------|
| Dox | 13.12±1.12 |
| NPh-Dox | 20.78±2.51 |
| NPh-Dox-cRGD | 16.76±2.04 |

В работе [30] было проведено аналогичное нашему исследованию цитотоксичности Dox на клеточной линии U-87 MG при инкубации с образцом H40-Dox-cRGD, представляющего собой cRGD-конъюгированный пептид с Dox в мицеллах, где было показано меньшее цитотоксическое действие образца, содержащего Dox и cRGD пептид. В другом исследовании [31] на линии клеток B16, экспрессирующей на своей поверхности интегрин $\alpha_v\beta_3$, схожий эффект был отмечен при оценке цитотоксического действия композиции с RGD пептидом, при этом противоопухолевый эффект в группе с RGD пептидом был выше в сравнение с группой, получавшей физиологический раствор.

В литературе описаны различные механизмы действия Dox на гибель клетки, в том числе, и апоптоза [32]. При встраивании лекарств в различные транспортные системы возможны изменения в их механизме цитотоксического действия, в том числе путей гибели клетки, поэтому с помощью метода проточной цитометрии исследовали возможные пути гибели опухолевых клеток на клеточной линии глиобластомы U-87 MG (рис. 2).

Из представленных на рисунке 2 данных видно, что для образца с минимальной концентрацией Dox происходит

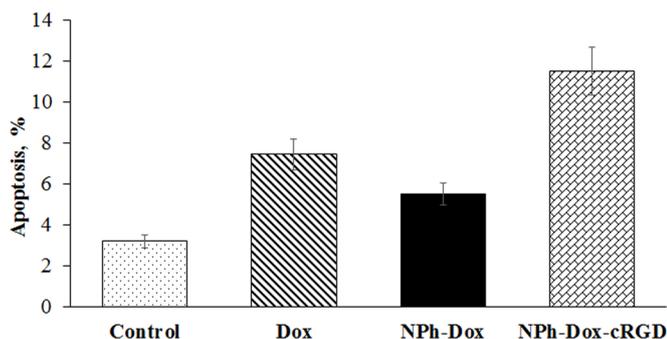


Рисунок 3. Процентное содержание клеток, подвергшихся раннему апоптозу, при инкубации с клетками U-87 MG при концентрации веществ по Dox 0.5 мкг/мл, определенное через 24 ч инкубации с образцами свободного доксорубина (Dox), встроенного в фосфолипидные НЧ (NPh-Dox), и встроенного в фосфолипидные НЧ с адресным пептидом (NPh-Dox-cRGD). Контроль – необработанные веществами клетки. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение ($n=3$) при $p \leq 0.05$.

отделение популяции, четко переходящей в область позднего апоптоза. При этом процент клеток, подверженных позднему апоптозу, в варианте фосфолипидной Dox-содержащей композицией увеличивался. При инкубации с композицией Dox, содержащей адресный пептид, данный показатель составлял 29.7%, для свободной формы Dox – 24.4%. При минимальной концентрации по Dox (0.5 мкг/мл) большой процент клеток, подверженных раннему апоптозу, был отмечен при инкубации клеток с композицией, содержащей адресный пептид (NPh-Dox-cRGD) (рис. 3).

При увеличении концентрации по Dox (5 мг/мл) основная популяция клеток подвергалась гибели посредством позднего апоптоза. Также процент клеток, подверженный гибели путем раннего апоптоза, был выше при инкубации с композицией, содержащей адресный пептид (NPh-Dox-cRGD). Однако при инкубации с данной композицией (NPh-Dox-cRGD) наблюдалось большее количество живых клеток (Q4), и меньший процент клеток, подверженных позднему апоптозу (Q2), процент клеток был не на много ниже, чем в варианте с клетками, инкубированными со свободным Dox (рис. 2). Для более детального понимания процесса гибели клеток необходимы дополнительные исследования механизма действия исследуемой композиции.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что использование адресного пептида не приводило к снижению/изменению цитотоксического действия Dox. Проведенное нами ранее исследование показало большее накопление Dox при инкубации экспрессирующих на своей поверхности интегрин $\alpha_v\beta_3$ опухолевых клеток с композицией, содержащей cRGD [25]. Полученные данные по оценке цитотоксичности и пути гибели опухолевых клеток *in vitro* также показывают перспективность NPh-Dox-cRGD.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение онкологических заболеваний, в частности ГБМ, связано с рядом сложностей. После хирургического вмешательства одним из методов последующего лечения является химиотерапия. Ряд недостатков при

использовании химиопрепаратов связан с неспецифическим их распределением в организме [33]. Эффективность химиотерапии ограничена в основном из-за недостаточной доставки большинства терапевтических препаратов в мозг, связанной с прохождением ГЭБ [34]. Для решения указанных недостатков проводится много исследований в области разработки различных наночастиц для встраивания лекарственных соединений, в частности, большинство работ направлено на разработку адресных систем доставки. В нашей предыдущей работе [25] была получена фосфолипидная композиция Dox с cRGD-пептидом в качестве адресного фрагмента с размером частиц 50 нм. В экспериментах *in vitro* по оценке накопления в клетках глиобластомы U-87 MG через 3 ч инкубации с веществами было показано повышение проникновения Dox внутрь клетки (интернализация) при инкубации с образцом NPh-Dox-cRGD практически в 1.4 раза по сравнению со свободным Dox. Дальнейшие исследования оценки цитотоксичности, выполненные в данной работе, показали при инкубации клеток U-87 MG с исследуемыми веществами наличие дозозависимого эффекта. В максимальной концентрации 30 мкг/мл (в пересчете на Dox) отмечено большее влияние фосфолипидных образцов независимо от наличия адресного пептида (для субстанции – 6%, для NPh-Dox-cRGD – 21%, для NPh-Dox – 17%), т.е. при встраивании Dox в фосфолипидные НЧ отмечено его меньшее цитотоксическое действие. Расчетные значения IC_{50} для фосфолипидной композиции были максимальны (20.78 мкг/мл) и превышали значения для свободной субстанции практически на 37%, а для композиции с адресным пептидом – на 19%.

Исследование пути гибели опухолевых клеток показало, что основной процент клеток был подвержен апоптотической гибели; следовательно, встраивание Dox в фосфолипидные НЧ и снабжение их адресным пептидом не влияло на механизм гибели клеток под действием Dox, усиливая его действие. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработанной композиции (NPh-Dox-cRGD) и целесообразности проведения дальнейших исследований для прояснения дополнительных механизмов в проявлении цитотоксического действия разработанной композиции.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные. Использование биологического материала осуществлялось в соответствии с методическими рекомендациями и на основании предусмотренных документов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Liu, D., Dai, X., Ye, L., Wang, H., Qian, H., Cheng, H., Wang, X. (2023) Nanotechnology meets glioblastoma multifactor: Emerging therapeutic strategies. Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology, **15**(1), e1838. DOI: 10.1002/wnan.1838
- Schaff, L. R., Mellinghoff, I. K. (2023) Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. JAMA, **329**(7), 574–587. DOI: 10.1001/jama.2023.0023
- Yang, J., Li, Y., Zhang, T., & Zhang, X. (2016) Development of bioactive materials for glioblastoma therapy. Bioactive Materials, **1**(1), 29–38. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.03.003
- Meng, L., Chu, X., Xing, H., Liu, X., Xin, X., Chen, L., Jin, M., Guan, Y., Huang, W., & Gao, Z. (2019). Improving glioblastoma therapeutic outcomes via doxorubicin-loaded nanomicelles modified with borneol. International Journal of Pharmaceutics, **567**, 118485. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118485
- Sági, J. C., Egyed, B., Kelemen, A., Kutszegi, N., Hegyi, M., Gézsi, A., Herlitschke, M. A., Rzepliel, A., Fodor, L. E., Ottóffy, G., Kovács, G. T., Erdélyi, D. J., Szalai, C., Semsei, A. F. (2018) Possible roles of genetic variations in chemotherapy related cardiotoxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia and osteosarcoma. BMC Cancer, **18**(1), 704. DOI: 10.1186/s12885-018-4629-6
- Maksimov, O., Malinovskaya, J., Shipulo, E., Osipova, N., Razzhivina, V., Arantseva, D., Yarovaya, O., Mostovaya, U., Khalansky, A., Fedoseeva, V., Alekseeva, A., Vanchugova, L., Gorshkova, M., Kovalenko, E., Balabanyan, V., Melnikov, P., Baklaushev, V., Chekhonin, V., Kreuter, J., Gelperina, S. (2019) Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. International Journal of Pharmaceutics, **572**, 118733. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733
- Shafei, A., El-Bakly, W., Sobhy, A., Wagdy, O., Reda, A., Aboelenin, O., Marzouk, A., El Habab, 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. Biomedicine & Pharmacotherapy, **95**, 1209–1218. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.059
- Weekes, C. D., Vose, J. M., Lynch, J. C., Weisenburger, D. D., Bierman, P. J., Greiner, T., Bociek, G., Enke, C., Bast, M., Chan, W. C., Armitage, J. O., Nebraska Lymphoma Study Group (2002) Hodgkin's disease in the elderly: improved treatment outcome with a doxorubicin-containing regimen. Journal of clinical oncology, **20**(4), 1087–1093. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.4.1087
- Fekih, L., Boussoffara, L., Fenniche, S., Abdelghaffar, H., Akrouf, I., Ayadi, A., Megdiche, M. L. (2011) Sarcome primitif rare de la paroi thoracique: le synoviosarcome [Rare primary chest wall sarcoma: the synoviosarcoma]. Revue des Maladies Respiratoires, **28**(5), 681–685. DOI: 10.1016/j.rmr.2011.03.012
- Aljarrah, K., Mhaidat, N. M., Al-Akhras, M. A., Aldaher, A. N., Albiss, B., Aldealat, K., & Alsheyab, F. M. (2012) Magnetic nanoparticles sensitize MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. World Journal of Surgical Oncology, **10**, 62. DOI: 10.1186/1477-7819-10-62
- Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R. (2013) Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, **65**(2), 157–170. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x
- Wang, K., Zhang, X., Liu, Y., Liu, C., Jiang, B., & Jiang, Y. (2014) Tumor penetrability and anti-angiogenesis using iRGD-mediated delivery of doxorubicin-polymer conjugates. Biomaterials, **35**(30), 8735–8747. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.042
- Thorpe, P. E., Chaplin, D. J., & Blakey, D. C. (2003) The first international conference on vascular targeting: meeting overview. Cancer Research, **63**(5), 1144–1147
- Wang, K., Shen, R., Meng, T., Hu, F., Yuan, H. (2022) Nano-Drug Delivery Systems Based on Different Targeting Mechanisms in the Targeted Therapy of Colorectal Cancer. Molecules (Basel, Switzerland), **27**(9), 2981. DOI: 10.3390/molecules27092981
- Torchilin V. P. (2010) Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. Handbook of Experimental Pharmacology, **197**, 3–53. DOI: 10.1007/978-3-642-00477-3_1
- Cheng, Y., Ji, Y. (2019) RGD-modified polymer and liposome nanovehicles: Recent research progress for drug delivery in cancer therapeutics. European Journal of Pharmaceutical Sciences, **128**, 8–17. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.11.023
- Pisano, M., De Paola, I., Nieddu, V., Sassu, I., Cossu, S., Galleri, G., Del Gatto, A., Budroni, M., Cossu, A., Saviano, M., Palmieri, G., Zaccaro, L., Rozzo, C. (2013) In vitro activity of the $\alpha v \beta 3$ integrin antagonist RGDechi-hCit on malignant melanoma cells. Anticancer Research, **33**(3), 871–879
- 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
- Li, H., Peng, W., Zhen, Z., Zhang, W., Liao, S., Wu, X., Wang, L., Xuan, A., Gao, Y., & Xu, J. (2023). Integrin $\alpha v \beta 3$ and EGFR dual-targeted [^{64}Cu]Cu-NOTA-RGD-GE11 heterodimer for PET imaging in pancreatic cancer mouse model. Nuclear Medicine And biology, **124-125**, 108364. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2023.108364
- Chen, W., Zou, Y., Zhong, Z., & Haag, R. (2017) Cyclo(RGD)-Decorated Reduction-Responsive Nanogels Mediate Targeted Chemotherapy of Integrin Overexpressing Human Glioblastoma In Vivo. Small, **13**(6). DOI: 10.1002/smll.201601997
- Miura, Y., Takenaka, T., Toh, K., Wu, S., Nishihara, H., Kano, M.R., Ino, Y., Nomoto, T., Matsumoto, Y., Koyama, H. (2013) Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. ACS Nano, **7**(10), 8583–8592. DOI: 10.1021/nn402662d
- Zhan, C., Gu, B., Xie, C., Li, J., Liu, Y., Lu, W. (2010) Cyclic RGD conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect. Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society, **143**(1), 136–142. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.12.020
- Zhan, C., Wei, X., Qian, J., Feng, L., Zhu, J., Lu, W. (2012) Co-delivery of TRAIL gene enhances the anti-glioblastoma effect of paclitaxel in vitro and in vivo. Journal of Controlled Release, **160**(3), 630–636. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.02.022
- Waite, C. L., Roth, C. M. (2009) PAMAM-RGD conjugates enhance siRNA delivery through a multicellular spheroid model of malignant glioma. Bioconjugate Chemistry, **20**(10), 1908–1916. DOI: 10.1021/bc900228m
- Kostruykova, L.V., Tereshkina, Yu.A., Tikhonova, E.G., Sanzhakov, M.A., Bobrova, D.V., Khudoklinova, Yu.Yu. (2022) Study of the efficiency of cellular accumulation of doxorubicin supplied with a targeted delivery system based on phospholipid nanoparticles with integrin-directed peptide. Biomeditsinskaya Khimiya, **68**(6), 437–443. DOI: 10.18097/PBMC20226806437
- IC50 Calculator. Retrieved September 2, 2023 from <https://www.aatbio.com>
- Wang, F., Li, Y., Shen, Y., Wang, A., Wang, S., Xie, T. (2013) The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. International Journal of Molecular Sciences, **14**(7), 13447–13462. DOI: 10.3390/ijms140713447
- TerBush, A. A., Hafkamp, F., Lee, H. J., & Coscoy, L. (2018). A Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection Mechanism Is Independent of Integrins $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha V \beta 3$, and $\alpha V \beta 5$. Journal of Virology, **92**(17), e00803-18. DOI: 10.1128/JVI.00803-18
- Xiao, Y., Hong, H., Javadi, A., Engle, J. W., Xu, W., Yang, Y., Zhang, Y., Barnhart, T. E., Cai, W., Gong, S. (2012). Multifunctional unimolecular micelles for cancer-targeted drug delivery and positron emission tomography imaging. Biomaterials, **33**(11), 3071–3082. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.030
- Xiao, Y., Hong, H., Javadi, A., Engle, J.W., Xu, W., Yang, Y., Zhang, Y., Barnhart, T.E., Cai, W., Gong, S. (2012) Multifunctional unimolecular micelles for cancer-targeted drug delivery and positron emission tomography imaging. Biomaterials, **33**(11), 3071–3082. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.030
- Wang, Y., Hun, W., Ding, B., Chen, D., Cheng, L. (2020) cRGD mediated redox and pH dual responsive poly(amidoamine) dendrimer-poly(ethylene glycol) conjugates for efficiently intracellular antitumor drug delivery. Colloids Surf. B. Biointerfaces, **194**, 111195. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111195
- Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kolat, D., Kaluzińska-Kolat, Z., Celik, I., Kontek, R. (2023). Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. Cells, **12**(4), 659. DOI: 10.3390/cells12040659
- Zhu, L., Lin, M. (2021) The Synthesis of Nano-Doxorubicin and its Anticancer Effect. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, **21**(18), 2466–2477. DOI: 10.2174/1871520621666201229115612
- van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M.C., Wesseling, P., Wurdinger, T., de Vries, H.E. (2015) Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, **19**, 1–12. DOI: 10.1016/j.drug.2015.02.002

Поступила: 30.10.2023
 После доработки: 24.11.2023
 Принята к публикации: 28.11.2023

INFLUENCE OF ADDING cRGD PEPTIDE TO PHOSPHOLIPIDE NANOPARTICLES WITH DOXORUBICIN INCLUDED ON APOPTOSIS IN GLIOBLASTOMA CELLS *IN VITRO*

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

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

One of the methods of treating glioblastoma after surgery is chemotherapy; the drugs used in this case, due to their nonspecific distribution, lead to a number of complications. One way to overcome this drawback is to supply drugs with delivery systems with targeted molecules. This approach allows increasing the accumulation of therapeutic agents directly at the lesion site, minimizing side effects. This work is a continuation of the study of the mechanism of action of the previously obtained phospholipid composition of doxorubicin with a targeted cRGD peptide (NPh-Dox-cRGD). This peptide is capable of selectively interacting with integrin $\alpha_v\beta_3$, a receptor expressed on the surface of a number of tumor cells, including glioblastoma. The work assessed the cytotoxic effect of the NPh-Dox-cRGD composition in comparison with the free substance (Dox) and embedded in phospholipid nanoparticles without a targeted ligand (NPh-Dox). It was shown that after 24 h of incubation of U-87 MG cells with substances at the maximum concentration of Dox (30 $\mu\text{g/ml}$), the percentage of viability cells was 6% for Dox, 21% for NPh-Dox-cRGD, and 21% for NPh-Dox – 17%, i.e. When Dox was incorporated into phospholipid NPs, its cytotoxic effect was observed to a lesser extent. No statistically significant differences were noted in the control line HeLa. Assessment of tumor cell death using flow cytometry indicated that most of the cells died via apoptosis. When incubated with a composition containing a targeting peptide, NPh-Dox-cRGD, at a concentration (Dox) of 0.5 $\mu\text{g/ml}$, the percentage of cells susceptible to late apoptosis was 29.7%, for the free form – 24.4%. An assessment of cells susceptible to early apoptosis (Dox concentration 0.5 $\mu\text{g/ml}$) showed that the percentage of these cells for the sample with the peptide was higher and amounted to 11.4%.

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

FUNDING

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

Received: 30.10.2023, revised: 24.11.2023, accepted: 28.11.2023