

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЮТЕИНА И ЦИСПЛАТИНА В СОЧЕТАНИИ С ЛИПОСОМАМИ ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛЕТКАМ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРОШЕДШИМ ВОЗДЕЙСТВИЕ РАДИОТЕРАПИИ

© 2023 г. Р.А. Лафта*, М.В. Шафаа*, #, В.М. Дарвиш**, М.С. Эль-Нагди*

*Факультет естественных наук, Хелуанский университет, Каир, 11765, Египет

**Отдел полимеров и пигментов Национального исследовательского центра,
ул. Эльбухут, округ Докки, Гиза, 12622, Египет

#E-mail: Shafaa@science.helwan.edu.eg

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

После доработки 10.11.2021 г.

Принята к публикации 26.11.2021 г.

Охарактеризованы взаимодействия противоопухолевого вещества цисплатина и антиоксидантного вещества лютеина с липосомами, выбранными в качестве модельных мембран. Морфология всех липосом была практически сферической, при этом в отсутствие этих веществ липосомы были более равномерно распределены и менее склонны к агрегации. Средний размер ненагруженных липосомных образцов составлял 617.90 ± 75.64 нм, в то время как после включения цисплатина, лютеина и их комбинации он составлял 425.60 ± 64.74 нм, 877.85 ± 93.90 нм и 189.91 ± 136.84 нм, соответственно. Включение цисплатина или лютеина в липосомные мембраны приводило к увеличению значений дзета-потенциала. В присутствии цисплатина в комбинации с лютеином дзета-потенциал достигал наименьших значений. Включение цисплатина в липосомы приводило к сдвигу в сторону более высокой температуры плавления по сравнению с основным пиком ненагруженных липосом, что указывает на конформационное нарушение структуры фосфолипидов. Добавление лютеина приводило к исчезновению основного характерного для чистых липосом эндотермического пика. Исследование методом ИК-Фурье-спектроскопии подтвердило взаимодействие лютеина и цисплатина с функциональными группами липосом. В отсутствие внешнего гамма-облучения значение IC_{50} для свободного лютеина в тесте цитотоксичности с клетками MCF-7 составило 10.62 мкг/мл, в то время как для свободного цисплатина оно составило 41,02 мкг/мл. Для нанолипосомного лютеина и цисплатина значение IC_{50} составило 65.84 мкг/мл и 34.29 мкг/мл соответственно. При использовании комбинированной терапии с дозой гамма-излучения 5 Гр и затем 10 Гр, IC_{50} свободного лютеина снизилась с 17.0 до 9.5 мкг/мл. Для свободного цисплатина IC_{50} изменилась с 51.00 до 43.09 мкг/мл. Эта работа показала, что цитотоксический эффект стандартной формы лютеина сильнее, чем нанолипосомального лютеина. Согласно обнаруженным фактам можно предложить новый протокол терапии, в котором цисплатин следует заменить свободным лютеином для увеличения эффективности терапии против опухолевых клеток линии MCF-7.

Ключевые слова: лютеин; цисплатин; липосомы; FTIR-спектроскопия; цитотоксичность; гамма-облучение.

DOI: 10.31857/S0006302923050198, EDN: MZUSUE

Рак — это термин, используемый для описания группы заболеваний, при которых аномальные

клетки делятся и распространяются бесконтрольно. В отсутствие сдерживания опухолевого роста это ведет к смерти. Рак является второй наиболее распространенной причиной смерти после заболеваний сердечно-сосудистой системы, вызывающих один случай смерти из четырех. Среди методов лечения рака применяются хирургия, радиотерапия, химиотерапия, иммунотерапия и направленная терапия [1].

Сокращения: DPPA — дипальмитоилфосфатидная кислота, FTIR-спектроскопия — инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием, LipoCis — липосомы с цисплатином, LipoLut — липосомы с лютеином, LipoCisLut — липосомы с цисплатином в сочетании с лютеином, ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия, МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, ИПД — индекс полидисперсности.

Наряду с раком легкого рак груди (рак молочной железы) — вторая по распространенности причина смертности. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения ожидается, что в 2050 г. будет зарегистрировано 27 миллионов случаев рака молочной железы и 17.5 миллионов случаев смерти от него [2].

Применение наноразмерных носителей, в том числе на основе липидов, позволило добиться существенных успехов в лечении рака. В настоящее время доступны разные формы липидных носителей — липидные наночастицы и другие наноструктурированные липидные носители. Вследствие их биосовместимости и биodeградируемости эти липидные модели менее токсичны, чем другие системы доставки лекарств, такие, как полимерные наночастицы. Липосомы — это сферические искусственные носители, состоящие из липидного бислоя и полости внутри, которая может быть заполнена химиотерапевтическим средством для его доставки в очаг опухоли [3]. Вследствие их эффективности, биосовместимости, неиммуногенности, повышенной растворимости в них химических агентов и способности к инкапсуляции широкого диапазона веществ, эти наноразмерные пузырьки липидного бислоя стали широко распространены в системах доставки лекарств. В результате липосомальное применение противораковых веществ увеличит их эффективность, снижая воздействие веществ на здоровые ткани или снижая дозу, необходимую для проявления цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам.

Дипальмитоилфосфатидная кислота (DPPA) — важный промежуточный метаболит, производимый в основном вследствие гидролиза глицерофосфолипидов фосфолипазой D. DPPA важна для контроля входа веществ внутрь клетки через плазматическую мембрану [4]. DPPA обладает рядом преимуществ, включая способность предотвращать агрегацию липосом вследствие электростатического отталкивания, способность образовывать латеральные нанокластеры по заряд-зависимому механизму, способность накапливаться в опухолях и поглощаться по механизму эндоцитоза, и способность увеличивать стабильность липосом. Таким образом, в последние годы возрастает интерес к использованию DPPA как основного компонента липидного бислоя при приготовлении липосом [5, 6].

Цисплатин — это вещество на основе платины, широко используемое для лечения различных солидных опухолей (плоскоклеточный рак головы и шеи, карциномы семенников и яичников, продвинутое стадии рака мочевого пузыря, злокачественные глиомы, метастазированный рак простаты, молочной железы, меланома, мезотелиома). Благодаря высокому атомному номеру платины (78) увеличивается вероятность взаимодействия излучения с цисплатином, что приводит

к высвобождению высокоэнергетического низкоэнергетического вторичного электрона. Цисплатин также способен генерировать свободные радикалы, что вызывает существенные повреждения ДНК [7]. Цисплатин может выступать как радиосенсибилизатор, увеличивая дозу радиации, поглощенную опухолевым очагом. Радиосенсибилизаторы используются в лучевой терапии для увеличения поглощенной дозы радиации через увеличение собственной радиочувствительности раковых клеток. Благодаря этому может проводиться терапия меньшими дозами радиации, что снижает побочное воздействие на нормальные клетки [8].

Лучевая терапия — это метод, который обычно используется тогда, когда опухоль ограничена конкретной зоной организма, на которую физически воздействует. Поскольку она разрушает ДНК, в том числе гены, контролирующие репликацию и развитие, она является эффективным методом лечения рака. Вследствие прямого поглощения радиация может вызывать повреждения ДНК и клеточную гибель, а кроме того, она может запускать образование свободных радикалов, ионизируя молекулы воды внутри клеток, в особенности вблизи молекул ДНК [9].

Комбинация цисплатина и лучевой терапии — распространенная схема лечения различных форм рака. Во время терапии эти два агента обладают значительной синергией, но механизм этой синергии в целом не до конца ясен. Механизм радиосенсибилизации цисплатином был исследован на *in vitro* моделях рака груди, который все еще остается значительной проблемой для мирового здравоохранения. Поскольку большинство опухолей такого типа диагностируются очагово, лучевая терапия является самым эффективным способом лечения.

Каротиноиды — это липофильные пигменты полиизопреноидной структуры, получаемые в основном из растений. Согласно эпидемиологическим исследованиям, женщины с повышенным уровнем каротиноидов в пище — таких, как α -каротин, β -каротин, ликопин и лютеин/зеаксантин, обладают меньшим риском развития рака молочной железы [10]. Каротиноид лютеин является нетоксичным, по крайней мере для людей, потребляющих его в терапевтических дозах [11]. Предыдущие исследования показали, что лютеин оказывает многоплановое воздействие — противовоспалительное, антиоксидантное, противораковое, в частности, замедление роста и цитотоксическое действие на ряде раковых клеточных линий и опухолей на животных моделях [12].

Насколько нам известно, до сих пор не проводилось исследований взаимодействия цисплатина с фосфолипидами в отсутствие или в присутствии лютеина с точки зрения термотропного фазового поведения фосфолипидов, изменения конформации ацильных цепей или характерных

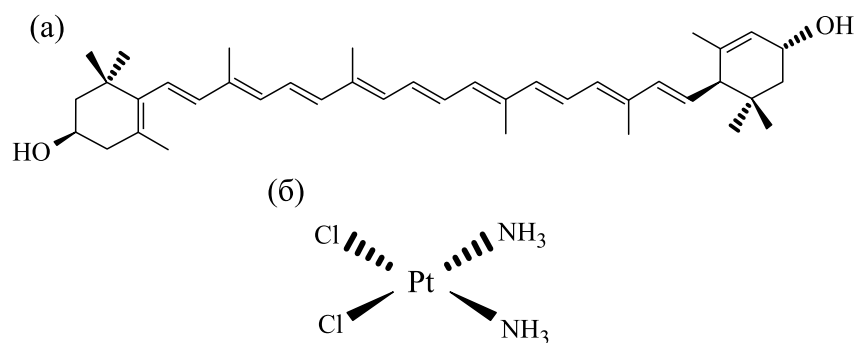


Рис. 1. Химическая структура лютеина (а) и цисплатина (б).

для PO_2^- -групп полярных головок полос в спектрах. К настоящему времени также не проводились исследования цисплатина, лютеина и их комбинации в свободной или нанолипосомной формах в плане их воздействия на клеточную линию MCF-7 (культура клеток рака молочной железы).

Данное исследование проводилось с целью оценки изменений, вносимых цисплатином в физическую структуру и свойства дипальмитоилфосфатидной кислоты как модельной липидной мембраны в отсутствие и в присутствии лютеина через оценку возмущений в тонкой структуре бислоя с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR-спектроскопии), просвечивающей электронной микроскопии, динамического светорассеяния, измерений полидисперсности, дзета-потенциала и дифференциальной сканирующей калориметрии. Кроме того, в статье исследуется эффективность цитотоксического действия свободного цисплатина в отсутствие или в присутствии свободного лютеина, а также липосомальных форм этих веществ, на клетки линии MCF-7 (линия рака молочной железы) в комбинированной терапии после гамма-облучения различными дозами.

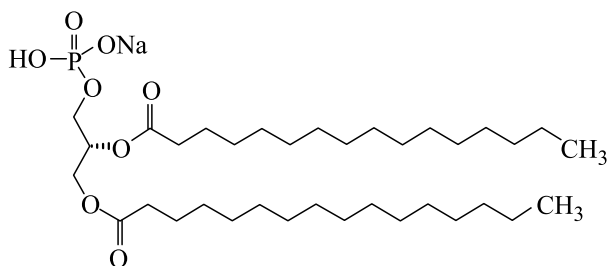


Рис. 2. Схематичная структурная формула дипальмитоилфосфатидной кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Лютеин получали из природных источников и оценивали их чистоту с помощью методов тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Структуру лютеина подтверждали спектроскопическими методами. Молекулярная масса лютеина составляет 568.87 Да. Цисплатин был приобретен в компании Sigma (Сент-Луис, США). Его молекулярная масса составила 300.05 Да. Молекулярная структура лютеина и цисплатина показана на рис. 1.

Этиловый спирт (абсолютный, чистотой 99.9%) приобретали в компании DaeJung Chemicals (Сихын, Кёнгидо, Республика Корея). Дипальмитоилфосфатидную кислоту приобретали в компании Sigma (Сент-Луис, США). Ее молекулярная масса составляла 648.9, чистота 99% (рис. 2). Трис покупали в основной форме (молекулярная масса 121.1 Да) в компании CDH (Нью-Дели, Индия). Клетки линии MCF7 (клеточная линия рака молочной железы) хранили при -180°C в жидком азоте согласно рекомендациям ATCC. Затем культуры размножали посредством серийных пересевов в Центре вакцинации Ваксера (Каир, Египет). Диметилсульфоксид, среда DMEM, бикарбонат натрия, трипановый синий (0.05%-й изотонический раствор в физиологическом растворе), пенициллин/стрептомицин, трипсин, уксусная кислота, плодная сыворотка телят, сульфородамин В (0.4%-й раствор в 1%-й уксусной кислоте), трихлоруксусная кислота, изопропанол были приобретены в компании Sigma Chemical Co. (США). Все растворы готовили на основе чистой дистиллированной воде. Все растворители и другие реактивы были хроматографической чистоты.

Приготовление липосом. Смесь DPPA : цисплатин в молярном соотношении 7 : 2 использовали для приготовления нейтральных мультиламеллярных везикул методом гидратации тонкой пленки по Бангхэму [13]. 20 мг DPPA и 2.64 мг цисплатина в отсутствие или в присутствии 5 мг лютеина (молярное отношение к DPPA 2 : 7) пере-

носили в колбу объемом 100 мл с круглым дном. Затем добавляли 20 мл этанола и встряхивали колбу до растворения всех компонентов. С помощью ротационного вакуумного испарителя в тепловой водяной бане (50°C) последовательно удаляли органический растворитель для образования однородной тонкой пленки липида на внутренней стенке колбы. Затем липид гидратировали буферным раствором с трисом (0.2 М, pH 7.2 при 37°C) для последующего образования мультислойных везикул на водяной бане при 50°C в течение 15 мин. После этого колбу ставили на механический встряхиватель при 50°C на 1 час и использовали ток азота для продувки колбы, после чего колбу закрывали. Ненагруженных липосомы, служившие в качестве контроля, готовили по такой же схеме, используя только аликвоты DPPA, равные тем, что использовались в опытных образцах.

Измерение эффективности инкапсуляции. Эффективность инкапсуляции цисплатина в липосомы DPPA измеряли после экстракции невключенного в липосомы цисплатина и центрифугирования при 14000 об/мин в течение 20 мин. Цисплатин, оставшийся в супернатанте, определяли спектрофотометрически по поглощению при 301 нм на спектрофотометре Jasco V-630. Длина волны соответствовала максимуму поглощения цисплатина. Поглощение супернатанта каждого образца сравнивали с калибровочной

кривой, построенной для разных концентраций цисплатина.

Для определения эффективности включения в липосомы лютеина экстракцию проводили в соответствии с методикой, опубликованной в работе [14]. Для получения свободного лютеина в суспензии, 2 мл этанола и 100 мкл аликвоты липосом, нагруженных лютеином, тщательно перемешивали в течение 3 мин на встряхивателе. Затем образцы центрифугировали 20 мин при 6000 об/мин для отделения супернатанта. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях. Поглощение лютеина измеряли спектрофотометрически при 446 нм. Определяли содержание лютеина в экстрактах, используя следующую формулу для расчета:

$$W (\text{мг}) = \frac{A \cdot V \cdot 10^3}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \cdot DF,$$

где W — масса каротиноида, A — оптическая плотность (значение должно быть от 0.2 до 0.8), V — объем лютеинсодержащей жидкости, $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ — коэффициент экстинкции каротиноида (2550 для лютеина в этаноле), DF — фактор разбавления [15].

Определение эффективности включения вещества в липосомы. Эффективность включения вещества (EE , %) рассчитывали через следующее соотношение:

$$EE = \frac{\text{Total drug input (мг)} - \text{Drug in supernatant (мг)}}{\text{Total drug input (мг)}} \cdot 100, \quad (1)$$

где *Total drug input* — общая масса вещества, *Drug in supernatant* — масса вещества в супернатанте.

Исследование морфологии липосом на просвечивающем электронном микроскопе. Размер и морфологию ненагруженных липосом и липосом с цисплатином (LipoCis), лютеином (LipoLut) или цисплатином в сочетании с лютеином (LipoCis-Lut) анализировали с применением просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Japan), работающего при напряжении 200 кВ, с применением негативного контрастирования. Водный раствор фосфовольфрамовой кислоты (1% w/v) использовали как агент для негативного контрастирования. Образцы липосом сперва разбавляли 1:10 буферным раствором (трис-HCl, pH 7.4 при 37°C), для микроскопического исследования отбирали по 20 мкл образца, наносимого на покрытую углеродом медную сетку микроскопа. Затем раствор оставляли на 1 мин, после чего удаляли излишки образца с сетки. Полученные на электронном микроскопе микрофотографии образца объединяли и обрабатывали.

Динамическое светорассеяние и дзета-потенциал. Дзета-потенциал, средний размер частиц и распределение по размеру липосом, нагруженных цисплатином и лютеином, только цисплатином, только лютеином, а также ненагруженных липосом, были рассчитаны с помощью метода PSS (particle sizing method), примененного для данных динамического светорассеяния при pH 7.4 в буферном растворе триса при 25°C. Эксперимент проводили в трех повторностях, все данные выражали как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Измерения методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Для определения поведения ненагруженных липосом и липосом, нагруженных цисплатином, лютеином или комбинацией цисплатина и лютеина при нагревании использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью прибора Setaram (Labsys, Франция), откалиброванного по индиевому образцу. Анализ проводили на образцах массой 5 мг, запечатанных в стандартные алюминиевые ячейки. Каждую термограмму

строили в диапазоне температур 25–200°C при скорости нагрева 3°C/мин.

Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием. FTIR-спектры лиофилизированных образцов липосом, нагруженных лютеином, цисплатином, их комбинацией и ненагруженных липосом, нанесенных на диски из бромида калия, регистрировали с помощью спектрометра Alpha II (Bruker, Швейцария). Сканирование осуществляли со скоростью 2 мм/с в диапазоне 400–4000 см⁻¹ при комнатной температуре.

Оценка цитотоксичности *in vitro* с помощью МТТ-теста. Клетки карциномы молочной железы линии MCF-7 промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали трипсином и ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640, затем считали жизнеспособные клетки в камере гемоцитометра с помощью методики с трипановым синим [16]. Для анализа хемочувствительности клетки культивировали в 96-луночном планшете при плотности 10⁴ клеток на лунку в течение 24 ч перед обработкой химиотерапевтическим агентом, чтобы клетки могли прикрепиться к стенкам планшета. Через 24 ч из каждой лунки удаляли среду и заменяли свежей, содержащей исследуемые вещества при разных концентрациях, методом двукратных разведений. Потенциальную цитотоксичность чистых липосом и липосом, нагруженных цисплатином, лютеином или комбинацией цисплатина и лютеина оценивали в отдельных экспериментах. Для каждого вещества и каждой дозы эксперимент проводили в трех повторностях.

Затем монослои клеток инкубировали в течение 48 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ с разными концентрациями химиотерапевтических агентов. Среду, содержащую необходимые вещества, затем удаляли, а клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером. В каждую лунку немедленно добавляли 50 мкл раствора (0.5 мг/мл) желтой соли метилтиазолилтетразолия (МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем удаляли среду и добавляли 50 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана.

Для оценки доли жизнеспособных клеток поглощение образующегося хромофорного субстрата анализировали при 490 нм с помощью прибора для иммуноферментного ELISA-анализа (Boster Immunoleader, США). Выживаемость клеток определяли как истинное поглощение лунок, поделенное на поглощение контроля и выраженное в процентах. Зависимости между выживаемостью клеток и концентрацией вещества представляли в виде графиков кривой выживаемости клеток рака груди линии MCF-7 по отношению к каждому конкретному препарату, по полученным кривым рассчитывали концентрацию веществ, ингибиру-

ющую рост клеток на 50% (полуингибирующая концентрация, IC₅₀).

***In vitro* облучение линии клеток карциномы молочной железы MCF-7.** Клеточную линию рака молочной железы MCF-7 выращивали в течение 24 ч в культуральных колбах с площадью поверхности 25 см² до значений плотности клеток 1·10⁴, после этого обрабатывали исследуемым веществом в концентрации, рассчитанной из МТТ-теста и равной IC₅₀. Затем проводили облучение гамма-лучами в дозах 5 и 10 Гр с помощью установки на изотопе ¹³⁷Cs Gamma-cell 40 (Канада) с дозой излучаемой радиации 0.653 рад/с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность включения вещества в липосомы составляла более 90% для всех приготовленных суспензий липосом, когда вещество смешивали с порошком липида до растворения в этаноле.

Изображения, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, показаны на рис. 3. Морфология всех липосом, приготовленных в работе, была почти сферической, равномерной, с малой долей агрегатов для ненагруженных (рис. 3а) и нагруженных везикул. Микроскопия показала, что добавление цисплатина коррелирует со способностью липосом к плотной упаковке на поверхности (рис. 3б). Присутствие лютеина в липосомах (LipoLut, рис. 3в) увеличивало промежутки между соседними бислоями, что приводило к большему размеру липосом в сравнении с контрольными. Увеличение размера частиц может быть связано с более сильным взаимодействием лютеина с липидными бислоями липосом через образование водородных связей. Предполагается, что лютеин может встраиваться в гидрофобный участок бислоя, эти наблюдения согласуются с данными ДСК и FTIR-спектроскопии.

Гомогенность частиц коллоидной суспензии эффективно описывается индексом полидисперсности (ИПД). Значения этого индекса более 0.7 означают, что в образце очень большой диапазон размера частиц и в данном случае метод динамического светорассеяния неспособен дать стабильные результаты [17].

Рис. 4а показывает распределение по размеру образца чистых липосом из DPPA, мода которого была около 617.9 ± 75.64 нм с индексом полидисперсности (ИПД). Рис. 4б показывает снижение среднего размера до 425.6 ± 64.74 нм с ИПД 0.337 после включения цисплатина в липосомы, это может быть связано с электростатическим притяжением между отрицательно заряженными PO₂⁻-группами DPPA и NH₃⁺-группой цисплатина, при этом, поскольку цисплатин считается гидрофильным веществом, он должен быть со-

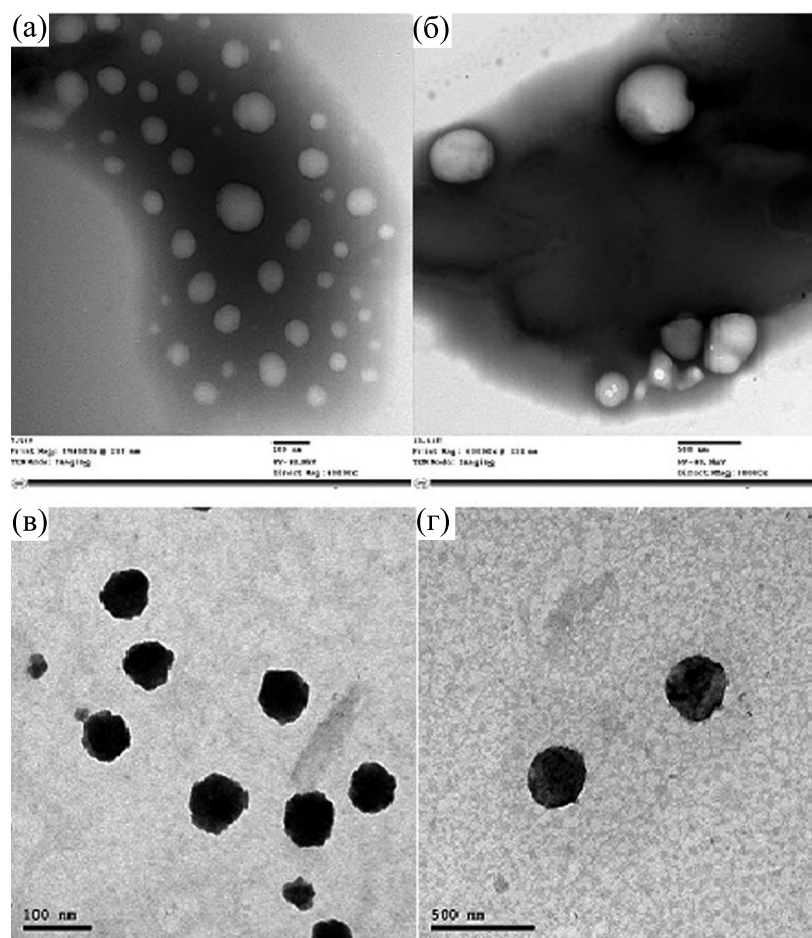


Рис. 3. Микрофотографии, полученные методом трансмиссионной микроскопии, ненагруженных липосом (а), липосом с цисплатином (б), липосом с лютеином (в) и липосом с комбинацией лютеина и цисплатина (г).

средоточен в гидрофильном ядре бислоя. Когда цисплатин добавляли в липосомы, расстояние между соседними бислоями уменьшалось, что приводило к уменьшению размеров липосом. Включение лютеина в DPPA приводило к увеличению расчетной моды диаметра липосом до 877.85 ± 93.90 нм с ИПД 0.527. После добавления лютеина к липосомам расстояние между соседними бислоями увеличивалось, в результате липосомы становились больше, чем контрольные. Более сильные взаимодействия вещества с полярной головкой фосфолипидов возле PO_2^- -группы с образованием водородных связей могут объяснить изменение размера липосом на рис. 4в. Лютеин может входить в ламеллярную структуру фосфолипида и должен располагаться параллельно углеводородной цепи фосфолипидного бислоя. Два его полярных конца находятся в контакте с противоположными полярными участками бислоя, что приводит к высокой смешиваемости с фосфолипидным бислоем и объясняет увеличение размера [18]. Рис. 4г показывает снижение расчетного значения размера липосом до $189.91 \pm$

136.84 нм с ИПД 0.426 после включения цисплатина в ассоциате с лютеином внутри липосом. Результаты показывают, что липосомы могут быть физически ассоциированы с цисплатином или лютеином в центре и их молекулы в большой степени взаимодействуют с липидным бислоем и нарушают их структуры. Эти данные хорошо согласуются с исследованиями методами динамического светорассеяния и FTIR-спектроскопии.

Амплитуда дзета-потенциала отражает стабильность коллоидной системы. По мере роста дзета-потенциала растет отталкивание между частицами, что приводит к большей стабильности коллоидной дисперсии. Если все взвешенные частицы обладают значительным отрицательным или положительным дзета-потенциалом, то они отталкиваются друг от друга и не склонны слипаться друг с другом [19].

Согласно данным других исследователей, ненагруженные липосомы обладают отрицательным дзета-потенциалом (-13.1 ± 6.49 мВ) [20–23]. У липосом, нагруженных цисплатином или лютеином, значения дзета-потенциала были

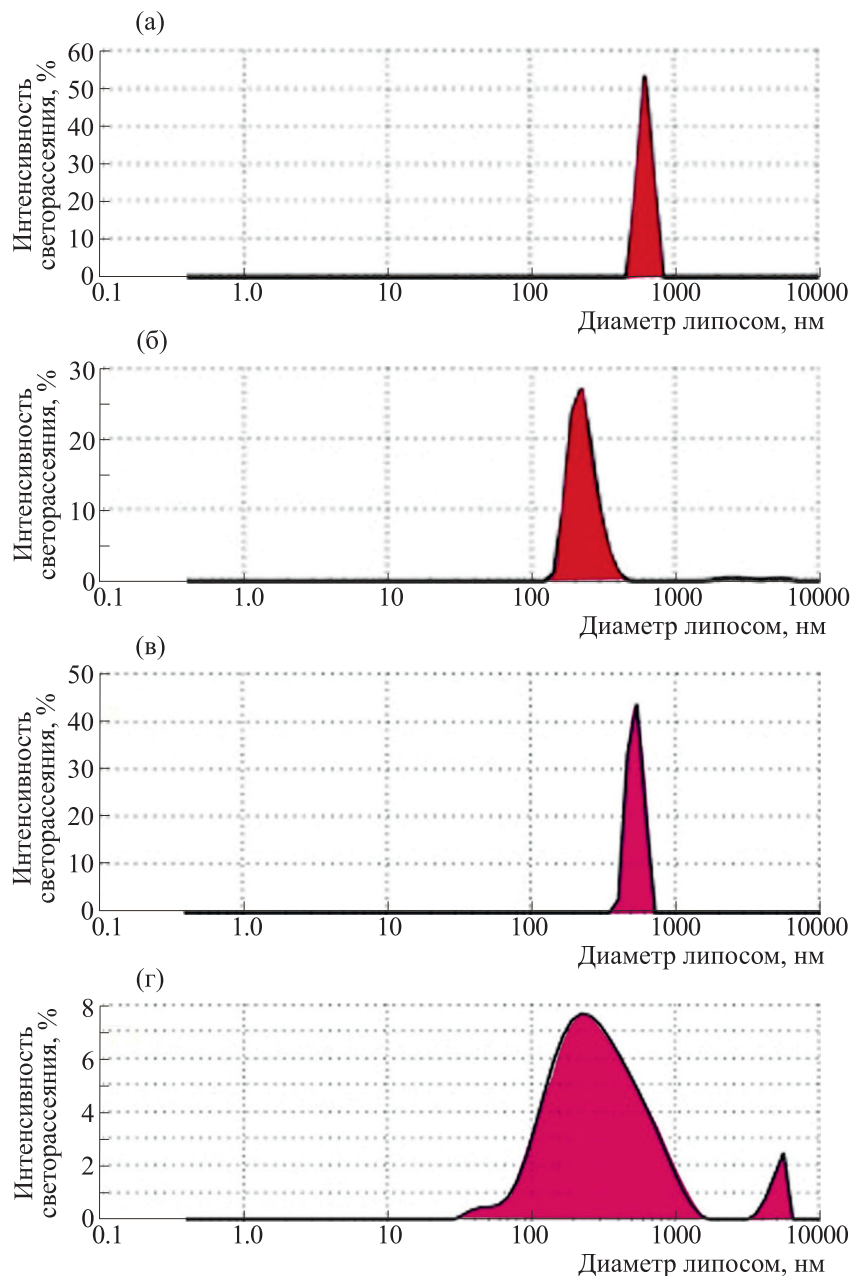


Рис. 4. Измеренные методом динамического светорассеяния размеры образца ненагруженных липосом (а), липосом с включением цисплатина (б), липосом с включением лютеина (в) и липосом с комбинацией цисплатина и лютеина (г).

еще более отрицательными (-14.52 ± 4.11 мВ и -15.55 ± 5.35 мВ, соответственно), чем у ненагруженных липосом, вследствие включения обоих веществ в липосомные мембраны. Наночастицы с дзета-потенциалом более $+30$ мВ или менее -30 мВ в общем случае обладают большей стабильностью. Наличие цисплатина (LipoCis) или лютеина (LipoLut) в липосомных мембранах, по-видимому, увеличивает поверхностную плотность отрицательного заряда, что приводит к более отрицательным значениям дзета-потенциала.

Липосомная система с цисплатином и лютеином (LipoCisLut) продемонстрировала наименее низкие значения среди всех исследованных веществ (-2.11 ± 5.66 мВ) по причине того, что отталкивание между частицами становится меньше, поэтому и коллоидная дисперсия становится менее стабильной (рис. 5). Результаты измерения размера частиц и дзета-потенциала липосомных дисперсий с различным составом приведены в табл. 1.

Вследствие изменения взаимодействий между включенными веществами и липосомами метод

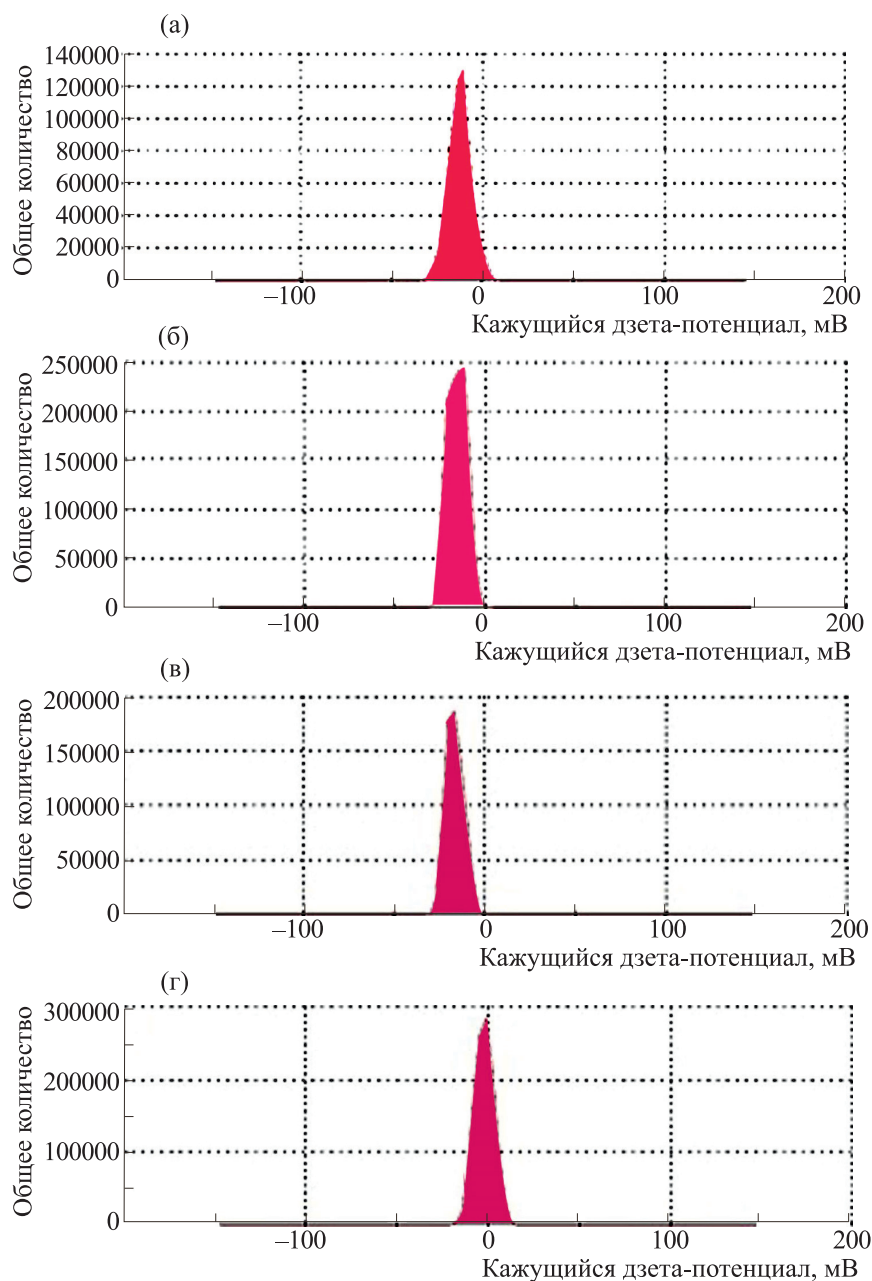


Рис. 5. Дзета-потенциал для образца ненагруженных липосом DPPA (а), липосом с включением цисплатина (б), липосом с включением лютеина (в) и липосом с комбинацией цисплатина и лютеина (г).

Таблица 1. Данные, полученные для размера частиц, измеренного методом динамического светорассеяния, и дзета-потенциала липосом до и после включения цисплатина, лютеина и цисплатина в комбинации с лютеином

Название образца	Диаметр, среднее $\pm$ станд. отклонение, нм	Среднее значение ИПД	Дзета-потенциал, среднее $\pm$ станд. отклонение, мВ
Ненагруженные липосомы	617.9 ± 75.64	0.7	-13.1 ± 6.49
LipoCis	425.6 ± 64.74	0.337	-14.52 ± 4.11
LipoLut	877.85 ± 93.90	0.527	-15.55 ± 5.35
LipoCisLut	189.91 ± 136.84	0.426	-2.11 ± 5.66

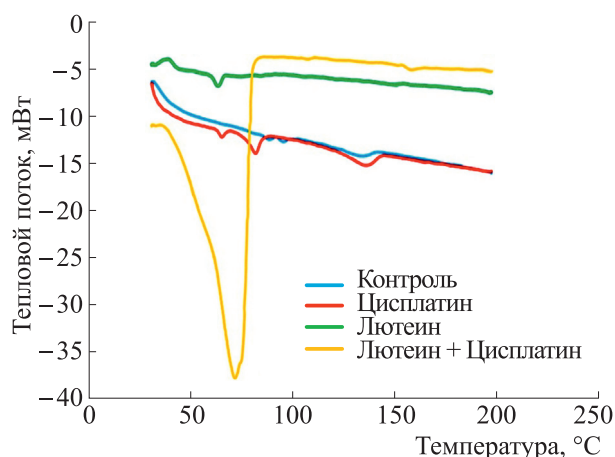


Рис. 6. Термограммы, полученные методом ДСК для липосом из чистой DPPA, а также липосом, нагруженных цисплатином, лютеином или комбинацией обоих веществ. По оси абсцисс — температура, по оси ординат — скорость теплового потока, мВт.

ДСК использовали для исследования изменений в фазовом переходе липидного бислоя [24, 25].

Везикулы DPPA используются как модельные мембраны, потому что этот фосфолипид имитирует многие свойства биологических мембран. Чистые везикулы DPPA после дегидратации демонстрировали значительный главный эндотермический пик (T_m) при 130.7°C (рис. 6) в процессе ДСК. Это согласуется с другими исследованиями [26–28]. Чистые липосомы DPPA также обладают двумя максимумами, соответствующими температурам пред-переходов (T_p) в районе 95.4 и 87.0°C соответственно.

Присутствие дополнительных соединений в мембранах DPPA может влиять на термотропные параметры фазового перехода везикул. Включение цисплатина в липосомы DPPA показало сдвиг в сторону более высоких температур, до 135.2°C, в сравнении с главным эндотермическим пиком чистых липосом при 130.7°C, что показывает существенный эффект цисплатина на бислой DPPA, выражающийся в конформационных изменениях внутри бислоя и снижении кооперативности фазового перехода липидных ацильных цепей [29, 30]. Увеличенная температура главного эндотермического пика (T_m) свидетельствует о том, что цисплатин приводит к более нарушенному и рыхлому расположению ацильных цепей. Два пика температуры пред-перехода в цисплатиновых липосомах снижаются (78.5 и 65.0°C соответственно), что указывает на взаимодействие цисплатина с полярными группами фосфолипидов (рис. 6).

Когда лютеин включен в липосомы DPPA, он обладает более выраженным эффектом. Лютеин в основном встраивается, сопрягаясь с липидными

бислоями, сильно взаимодействуя с ними и нарушая их структуру, что приводит к исчезновению главного эндотермического пика, который для чистых DPPA имеет место при 130.7°C.

Температура второго пред-перехода снизилась с 87.0°C до 63.1°C для липосом DPPA, нагруженных лютеином, что продемонстрировало эффект увеличения жесткости мембран. Пик первого пред-перехода, который у чистых DPPA приходится на 95.4°C, у лютеинизированных липосом исчезает. Встраивание биомолекул в липидные бислои может быть важной причиной исчезновения пика пред-перехода [31]. Встраивание фармакофора между полярных головок DPPA обеспечивает более предпочтительное значение тепловых параметров для образования менее упорядоченной жидкокристаллической фазы, чем для образования фазы геля, и, как показывает ДСК, немного снижает температуру перехода геля в жидкий кристалл [32].

Главный эндотермический пик чистых DPPA, который имеет место при 130.7°C, уширяется и сдвигается в зону более высоких температур (157.4°C), когда цисплатин встраивается в липосомы из DPPA в сочетании с лютеином. К удивлению, пик пред-перехода (T_p) для комбинации DPPA/(цисплатин + лютеин) увеличивается и составляет почти 71°C (рис. 6). Включение инкапсулированного цисплатина в ассоциации с лютеином в липофильную часть мембранного бислоя и их взаимодействие с полярной головкой может быть отражено в сдвиге этого пика (T_p). С помощью ДСК было показано, что смеси DPPA и лютеина или цисплатина обладают одним пиком, что указывает на их смешиваемость [33].

FTIR-спектроскопию использовали для определения изменений в структуре липосомных мембран по анализу волнового числа разных колебательных мод, чтобы подтвердить изменения, обнаруженные методом ДСК.

Для исследования потенциальных изменений структуры DPPA FTIR-спектроскопию использовали для оценки волнового числа разных функциональных групп в присутствии или в отсутствие чужеродных молекул, принимая во внимание вклад ацильных цепей и полярных головок липидных групп.

На рис. 7 показаны FTIR-спектры чистых лиофилизированных липосом DPPA в сравнении с липосомами, нагруженными цисплатином, лютеином или их комбинацией, в диапазоне волновых чисел 3000–1000 cm^{-1} .

Наиболее высокий характерный пик FTIR-спектров имел место у липосомных везикул [34]. Включение лютеина в липосомы DPPA привело к изменению волнового числа симметричных полос растяжения ацильных цепей (рис. 7), это указывает на то, что лютеин наводит конформационную упорядоченность внутри ацильных

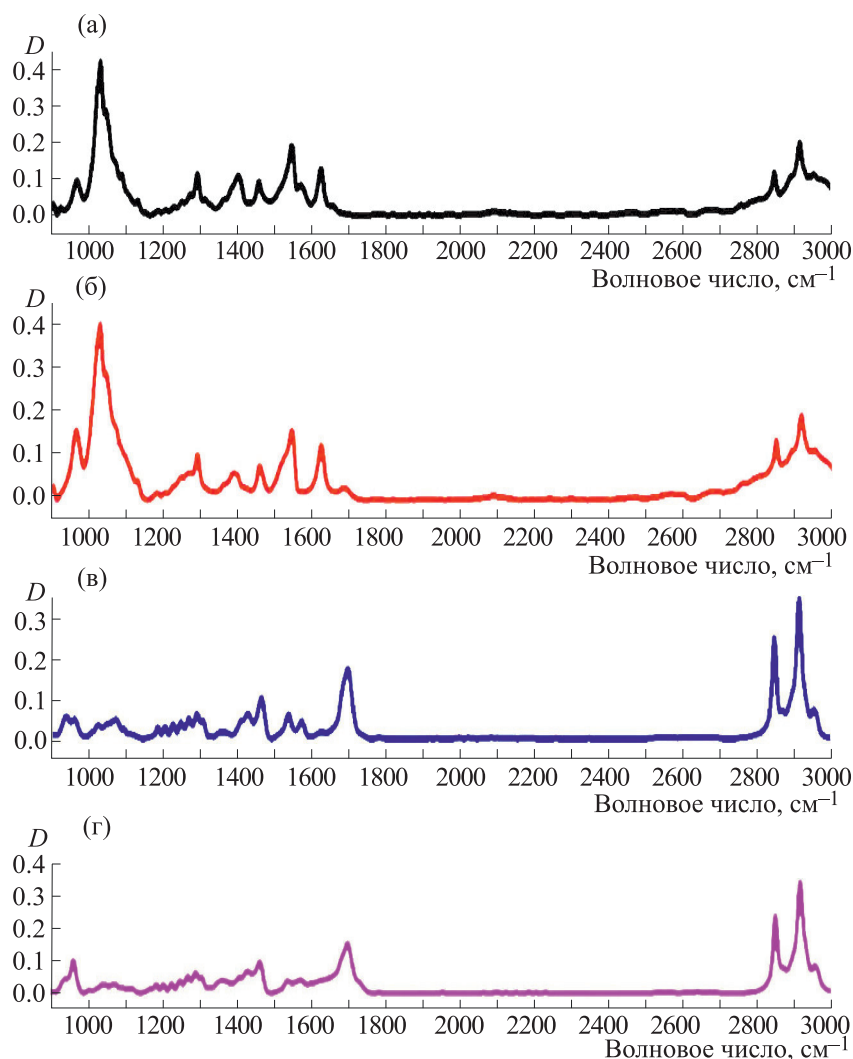


Рис. 7. Полные ИК-Фурье-спектры ненагруженных DPPA-липосом (а) и липосом, нагруженных цисплатином (б), лютеином (в) или обоими веществами (г). По оси абсцисс — волновое число, по оси ординат — поглощение.

цепей фосфолипидов. Другими словами, его молекулы повлияли на упорядоченность мембранной структуры. Пик при 2849.11 см^{-1} для чистых DPPA-липосом в случае лютеиновых липосом сдвинут в область более низких значений, 2847.05 см^{-1} . Это может указывать на снижение количества гош-конформеров, что приводит к возрастанию упорядоченности бислоя [35]. Интересно, что интенсивность сигнала липосом, нагруженных лютеином, становится выше по сравнению с ненагруженными липосомами. После включения цисплатина или цисплатина в сочетании с лютеином в липосомы DPPA пик при 2849.11 см^{-1} остается стабильным, что дает основания предположить стабилизацию системы в фазе геля и фазе жидкости.

Полоса антисимметричного колебания CH_2 -групп сдвинулась в сторону более низких значе-

ний при добавлении лютеина или лютеина в комбинации с цисплатином (2915.03 см^{-1}) в сравнении со значением, свойственным чистым DPPA-липосомам (2917.09 см^{-1}) (рис. 7).

Пики симметричных и антисимметричных колебаний CH_2 -групп на растяжение используются как чувствительные индикаторы степени упорядоченности алкильных цепей. В волновом числе для полосы колебаний CH_2 имеются значительные изменения, свидетельствующие о том, что лютеин снизил количество гош-конформеров, а следовательно, увеличил конформационную упорядоченность бислоя [36, 37]

Для определения взаимодействия цисплатина, лютеина либо обоих этих веществ с глицериновым остовом вблизи головки фосфолипидов (в «интерфазе») анализировали полосы колебаний связи $\text{C}=\text{O}$ [38]. Как видно из рис. 7, поглощение

Таблица 2. Химические сдвиги, наблюдаемые для цисплатина, лютеина или их комбинации после встраивания их в липосомы

Тип колебания	Волновое число, см^{-1}	Волновое число, см^{-1}			
		Контроль	Цисплатин	Лютеин	Цисплатин в сочетании с лютеином
Симметричное растяжение группы CH_2 ацильной цепи	(2800–2855)	2849.11	2849.11	2847.05	2849.11
Антисимметричное растяжение группы CH_2 в ацильной цепи	(2900–2925)	2917.09	2917.09	2915.03	2915.03
Растяжение карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$	(1730–1740)	1629.53	1629.53	1627.47	—
«Ножницеобразное» колебание CH_2 -группы	(1456–1470)	1462.66	1462.66	1466.78	1466.78
Антисимметричное растяжение группы PO_2 —	(1200–1300)	1295	1293.74	1293.74	1293.74

группы $\text{C}=\text{O}$ с волновым числом 1629.53 см^{-1} снижается или исчезает в образцах липосом с лютеином (1627.47 см^{-1}) или лютеином и цисплатином соответственно, что, очевидно, указывает на образование водородных связей. В глицериновом остове молекулы DPPA сдвиги контура колебания сложноэфирной $\text{C}=\text{O}$ -группы регулируют образование водородных связей. Значит, любые

изменения спектра в этой области могут быть вызваны взаимодействием лютеина или цисплатина с границей раздела полярной и неполярной областей мембраны [39].

Взаимодействие цисплатина, лютеина или обоих веществ с полярной головкой в липосомах DPPA исследовалось через анализ полосы антисимметричного колебания PO_2^- -группы при 1295 см^{-1} . Как показано на рис. 7, волновое число было сдвинуто в более низкие значения после добавления к липосомам DPPA цисплатина (1293.74 см^{-1}), лютеина (1293.74 см^{-1}) или смеси обоих веществ (1293.74 см^{-1}). Это указывает на образование водородных связей между головкой липида липосомы и лютеином или цисплатином. Уменьшение волнового числа указывает либо на то, что существующие водородные связи становятся сильнее, либо на то, что образуются новые водородные связи между компонентами [35].

Ксантофиллы или полярные каротиноиды, такие как лютеин, располагаются практически перпендикулярно плоскости мембраны в полярном участке липидных головок, а также пересекают липидный бислой, закоряваясь своими гидроксильными группами и оставаясь неподвижными в толще мембраны [40].

Включение лютеина или его комбинации с цисплатином в препарат липосом DPPA влияет на «ножницеобразные» колебания CH_2 -группы, мода которых имеет волновое число 1462.66 см^{-1} . После инкапсуляции лютеина или его конъюгата с цисплатином в липосомы DPPA это значение увеличивается до 1466.78 см^{-1} . Это позволяет утверждать, что лютеин или его комбинация с цисплатином играют роль своеобразных малых спейсеров для полярной группы липида, вызывая малые нарушения в углеводородной цепи. В табл. 2 приводятся значения химических сдвигов

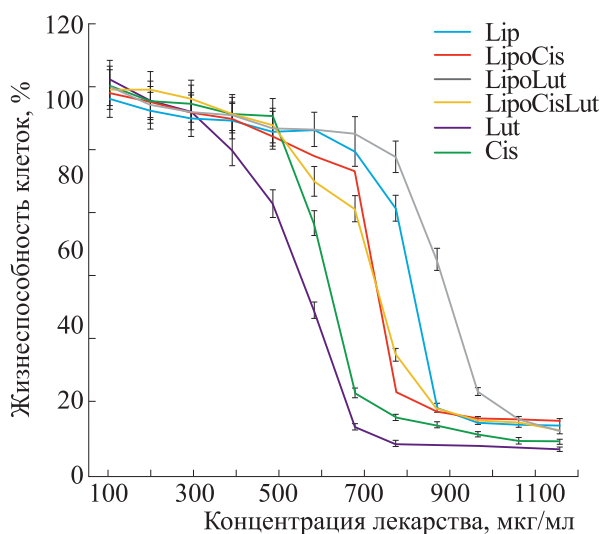


Рис. 8. *In vitro* цитотоксичность свободных липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut) и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) в отсутствие внешнего гамма-облучения на клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7; инкубацию проводили в течение 48 ч при различных концентрациях веществ — от 100 до 1200 мкг/мл. Для измерения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Результаты приведены как среднее и стандартное отклонение в трех повторностях. По оси абсцисс — концентрация, мкг/мл; по оси ординат — жизнеспособность клеток, %.

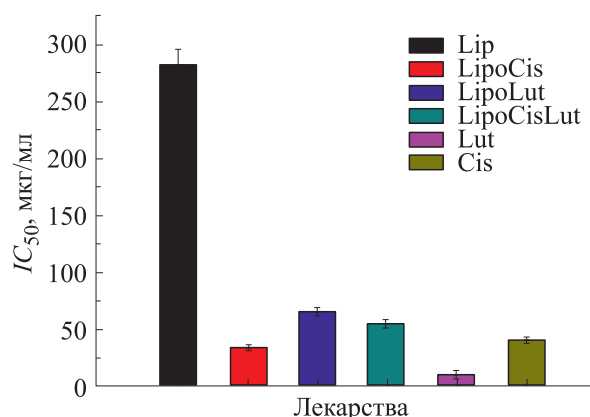


Рис. 9. Значения IC_{50} для свободных липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut) и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut и LipoCisLut) в отсутствие внешнего гамма-излучения в тесте цитотоксичности (МТТ-тесте) на клетках карциномы молочной железы через 48 ч после обработки.

для цисплатина, лютеина или их смеси после включения в липосомы из DPPA.

Эффективность систем доставки фармакопрепаратов в отсутствие и в присутствии гамма-излучения проверяли на линии клеток карциномы молочной железы (MCF-7) с помощью МТТ-теста выживаемости клеток (тест цитотоксичности *in vitro*) при разных концентрациях чистых липосом, свободного цисплатина, свободного лютеина, и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut и LipoCisLut) [16]. Необработанные клетки использовались как контрольные (точки нулевой концентрации каждого вещества). В отдельном исследовании линия раковых клеток MCF-7 была проинкубирована при различных концентрациях веществ в диапазоне от 100 до 1200 мкг/мл в течение 48 ч (рис. 8). Тест заканчивали через 48 ч и проводили измерение жизнеспособности клеток.

В отсутствие внешнего гамма-облучения наибольшей цитотоксичностью против клеток линии MCF-7, которые обрабатывали веществами в одном и том же диапазоне концентраций, обладал свободный лютеин. Клетки MCF-7 при максимальной концентрации лютеина (1200 мкг/мл) обладали выживаемостью около 7% через 48 ч после инкубации. В то же время со свободным цисплатином выживаемость клеток была около 9.32%, а с липосомами, нагруженными лютеином (LipoLut) жизнеспособность клеток составляла 11.84%, в сравнении с 14.82% для цисплатиновых липосом (LipoCis) при той же концентрации (1200 мкг/мл). Такая сниженная эффективность веществ, солюбилизованных в виде липосом, может быть отнесена к их включению внутрь множества липоидных доменов внутри везикул. Цисплатин был наиболее токсичен для линии клеток рака груди MDA-MB-23, за ними следовали клетки рака молочной железы MCF-7 и затем нормальные фибробласты линии NIH/3T3, что было сходно с результатами нашей работы [8].

Интересно, что ненагруженные липосомы проявляли выраженное снижение выживаемости клеток в тестах на линии MCF-7 при той же концентрации (1200 мкг/мл). Жизнеспособность клеток составляла 13.60%. Это указывает на то, что клетки повреждались высокими концентрациями липосом DPPA. DPPA подавляла пролиферацию клеток и ангиогенез в опухолевых тканях трижды негативного рака молочной железы, согласно работам [5, 6]. В этих исследованиях предлагались предварительные доказательства применимости DPPA в терапии TNBC.

Интересно, что липосомная форма комбинации цисплатина и лютеина не приводила к сильному снижению выживаемости клеток MCF-7 при той же концентрации (1200 мкг/мл) в сравнении с другими веществами, встроенными в липосомы. Жизнеспособность клеток была равна примерно 12.72%. Видимо, комбинация цисплатина с лютеином не обладает способностью к синергии.

Цитотоксическое действие различных форм веществ при высоких концентрациях снижалось в следующем порядке: Lut > Cis LipoLut > LipoCisLut > Lipo > LipoCis, согласно рис. 8.

При более низкой концентрации (700 мкг/мл), клетки MCF-7, обработанные лютеином, показали выживаемость 13.23%, в то время как для его липосомной формы она была около 90.70%, а для цисплатина в свободной форме и его липосомной формы составила 22.14% и 80.88% соответственно (рис. 8).

В отсутствие внешнего гамма-облучения значение IC_{50} для свободного лютеина в цитотоксическом тесте с MCF-7 составило 10.62 мкг/мл, в то время как для свободного цисплатина оно равнялось 41.02 мкг/мл. Для липосомных форм лютеина и цисплатина оно составило 65.84 мкг/мл и 34.29 мкг/мл соответственно. На основании вышеприведенных результатов и в зависимости от типа клеток видно, что свободный лютеин про-

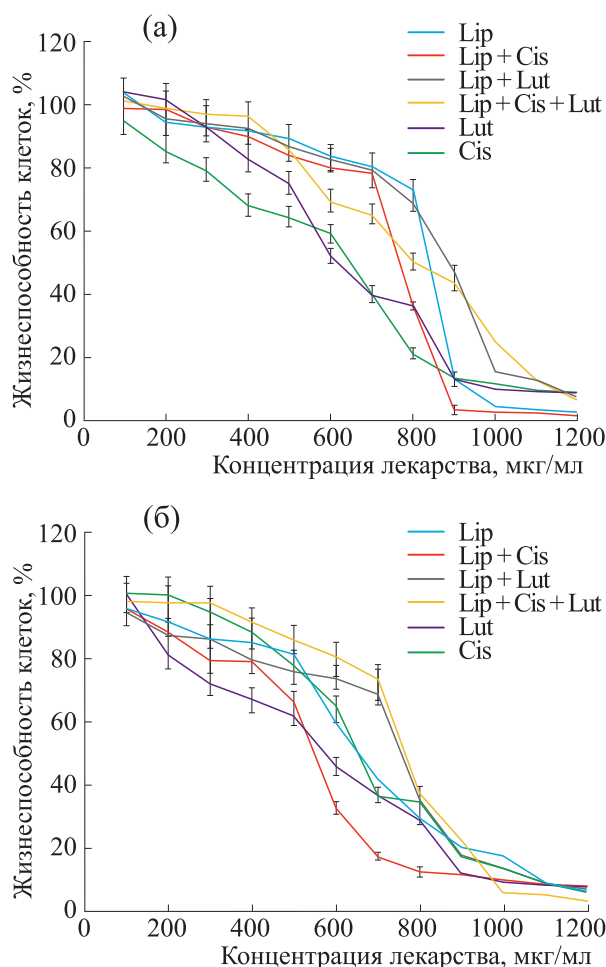


Рис. 10. *In vitro* цитотоксичность ненагруженных липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut), и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) в присутствии внешнего гамма-излучения в дозах 5 Гр (а) и 10 Гр (б) против клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7, инкубированной в течение 48 ч с различными концентрациями веществ — от 100 до 1200 мкг/мл. Для измерения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Результаты приведены как среднее и стандартное отклонение по трем повторностям. По оси абсцисс — концентрация, мкг/мл; по оси ординат — жизнеспособность клеток, %.

явил самую выраженную терапевтическую эффективность против клеток линии MCF-7 (рис. 9). Можно отметить, что IC_{50} для чистых липосом в тесте цитотоксичности на MCF-7 была равна 281.67 мкг/мл. Для липосомной комбинации цисплатина и лютеина она составила 55.56 мкг/мл. На линии клеток MCF-7 исследовались эффекты совместного применения бета-каротина и лютеина с очищенным астаксантином, выделенным из креветок, на цитотоксичность, окислительный статус, генерацию активных форм кислорода и активность опосредованных апоптозом сигнальных путей. Когда

астаксантин использовали в сочетании с низкими концентрациями бета-каротина и лютеина (5 мкмоль/л), IC_{50} и значения комбинационного индекса показали увеличение цитотоксичности и уровня окислительного стресса в сравнении с каротиноидами, примененными по отдельности. Результаты исследования избирательной гибели клеток MCF-7 обеспечивают лучшее понимание эффекта синергии между выделенным из креветок астаксантином и бета-каротином и лютеином [41].

Согласно работе [42], каротиноид лютеин селективно ингибирует развитие клеток рака молочной железы. Это следует из повышенной продукции активных форм кислорода, активации внутриклеточной сигнализации, такой, как p53-сигнальный путь, и увеличенной экспрессии HSP60, которые являются составными частями реализации этого механизма. Результаты, представленные в работе [42], позволяют предположить роль лютеина как нетоксичного селективного вещества, которое вызывает прерывание клеточного цикла и апоптоз в клетках линии рака молочной железы, включая трижды негативные клетки.

Степень сенсibilизации измеряли при разных вариантах обработки для того, чтобы исследовать характер соотношений между тестируемыми формами цисплатина и лютеина, дозой радиации и сенсibilизирующим действием цисплатина и лютеина.

Пролиферация/жизнеспособность клеток линии MCF-7 оценивали по МТТ-тесту после инкубации с тестируемыми химиотерапевтическими средствами в присутствии внешней радиации с дозами 5 и 10 Гр соответственно (рис. 10а,б) с применением ^{137}Cs в качестве излучающего изотопа. Цитотоксический эффект исследуемых веществ увеличивался при увеличении дозы от 5 до 10 Гр. Токсичность всех проверенных химиотерапевтических агентов возрастала в зависимости от концентрации. При максимальной концентрации (1200 мкг/мл) комбинированной с дозой радиации 5 Гр (рисунок 10а), токсический эффект LipoCis и свободных липосом значительно снижал жизнеспособность клеток — с 14.82% до 1.67% и с 13.60% до 3.13% соответственно. В этом тесте цитотоксичности липосомная форма комбинации цисплатина и лютеина (LipoCisLut) вызывала больше смертей клеток по сравнению с Lut и Cis по отдельности в виде свободных веществ. Жизнеспособность клеток снижалась с 12.72% до 7.88%. LipoLut выражено снижала выживаемость клеток с 11.84% до 6.67%. Такая возросшая цитотоксичность может быть вызвана преимущественным захватом клетками наночастиц, а не свободных веществ. Lut или Cis по отдельности не проявляли большей токсичности в присутствии дозы излучения 5 Гр, в этих случаях жизне-

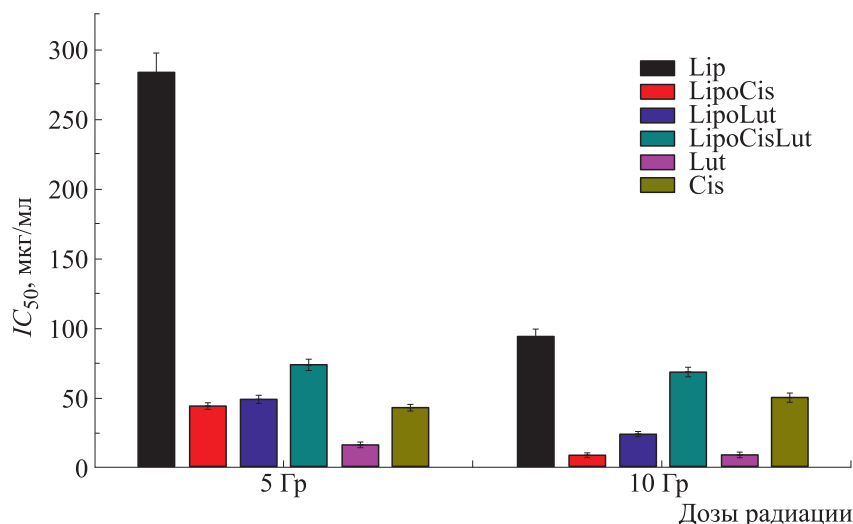


Рис. 11. значения IC_{50} для чистых липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut) и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) при гамма-облучении дозами 5 и 10 Гр по отношению к клеткам карциномы молочной железы (MCF-7) по данным МТТ-теста через 48 ч после обработки.

способность клеток сохранялась на уровне 8.67% и 9.33% соответственно.

Очевидно, что режим комбинированной терапии (LipoCis, Lip, LipoLut или LipoCisLut + радиация) обладает более выраженным противораковым эффектом по сравнению с режимом, не включающим облучение. Это позволяет заключить, что комбинация химиотерапии и радиотерапии будет более успешна, чем изолированные типы терапии.

Цитотоксическое действие различных комбинаций веществ при максимальной концентрации (1200 мкг/мл) и облучении клеток дозой 5 Гр снижалось, согласно рис. 10а, в следующем порядке: LipoCis > Lipo > LipoLut > LipoCisLut > Lut > Cis.

При более низкой концентрации веществ (700 мкг/мл) в комбинации с дозой радиации 5 Гр жизнеспособность клеток MCF-7, обработанных свободным лютеином, составляла 39.33% (сравним с липосомной формой, для которой она составила около 80.30%). В то же время для свободной формы цисплатина и его липосомной формы значения жизнеспособности составили 40.67% и 78.13% соответственно (рис. 10а).

Значение IC_{50} для свободного лютеина в тесте цитотоксичности с клетками MCF-7 в сочетании с дозой радиации 5 Гр равнялось 17 мкг/мл, в то время как для свободного цистеина оно составило 51 мкг/мл. Для липосомальных форм оно было равно 49.22 мкг/мл для лютеина и 44.27 мкг/мл для цисплатина. На основании вышеперечисленных результатов и в зависимости от типов раковых клеток свободный лютеин показал наивысшую терапевтическую активность против линии клеток MCF-7 (рис. 11). Можно заметить, что

IC_{50} свободных липосом была равна 284.5 мкг/мл в тесте цитотоксичности с MCF-7. IC_{50} для MCF-7, обработанных комбинацией цисплатина и лютеина в липосомах, составила 74.46 мкг/мл.

При максимальной концентрации (1200 мкг/мл) и высокой дозе радиации (10 Гр) цитотоксичность различных форм веществ убывала в следующем порядке: LipoCisLut > Lipo > LipoLut > Cis > Lut > LipoCis (см. рис. 10б). При более низкой концентрации (700 мкг/мл) и высокой дозе радиации (10 Гр) цитотоксичность снижалась в следующем порядке: LipoCis > Lut > Cis > Lipo > LipoLut > LipoLutCis (рис. 10б). Экспозиция клеток при более высокой дозе радиации увеличивает их чувствительность к химиотерапевтическим агентам. Это явно наблюдается при сравнении ответов клеток на дозу 5 Гр в сравнении с дозой 10 Гр (рис. 10а и 10б).

В присутствии гамма-радиации в дозах 10 Гр значение IC_{50} для свободного лютеина в тесте цитотоксичности на MCF-7 составило 9.5 мкг/мл, в то время как свободный цисплатин обладал значением IC_{50} , равным 43.09 мкг/мл. Для лютеина в форме липосом значение IC_{50} составило 24.2 мкг/мл, а для цисплатина в форме липосом — 9.29 мкг/мл. На основании вышеизложенных результатов свободный лютеин и липосомальный цисплатин показали максимальную терапевтическую активность против клеточной линии MCF-7 (рис. 11). Можно отметить, что IC_{50} ненагруженных липосом составила 94.84 мкг/мл в тесте цитотоксичности с MCF-7. Значение IC_{50} для липосом с комбинацией LipoCisLut составило 68.73 мкг/мл. Рис. 12 представляет суммирован-

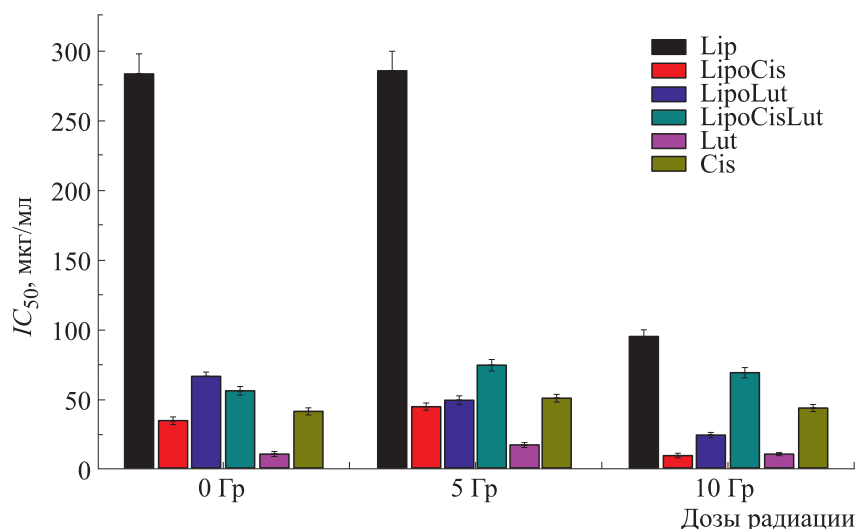


Рис. 12. Значения IC_{50} , полученные для чистых липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut), и их липосомных препаратов (LipoCis, LipoLut и LipoCisLut) в отсутствие и в присутствии гамма-радиации в различных дозах по отношению к клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7 с использованием МТТ-теста через 48 ч после обработки.

ные значения IC_{50} , полученные с помощью МТТ-теста для ненагруженных липосом, свободного цисплатина, свободного лютеина и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) в отсутствие и в присутствии гамма-излучения в различных дозах против линии карциномы молочной железы (MCF-7).

Цисплатин действует как радиосенсибилизатор, увеличивая количество радиации, доставляемое в зону опухоли. Радиосенсибилизаторы используются в радиационной терапии для увеличения поглощенной дозы радиации в очаге опухоли посредством увеличения собственной радиочувствительности раковых клеток. Поэтому терапия может производиться меньшими дозами радиации, снижая побочный эффект воздействия на нормальные клетки [8].

Существует существенная разница в цитотоксическом действии свободного лютеина и лютеина в липосомной форме. Мы предположили, что включение лютеина в липосомы DPPA может увеличивать способность наночастиц к агрегации, а это имеет место при высоких концентрациях и ведет к увеличению их размера (см. табл. 1). Авторы работы [43] обнаружили, что размер наночастиц играет очень важную роль в радиосенсибилизации. В результате наночастицы, нагруженные лекарствами, имели меньший радиосенсибилизирующий эффект, чем ненагруженные, особенно при высоких концентрациях лекарств. В результате химиотерапевтический эффект компенсировался этим снижением. В дополнение к эффективности в сочетании с локальной радиотерапией химиотерапия в комбинации с

радиацией очень важна, потому что химиотерапевтические агенты контролируют образование метастазов и предотвращают репарацию клеток. Также сниженная эффективность лютеина, солюбилизированного липосомами, может быть отнесена к его включению во многие липоидные домены внутри наночастиц.

Представленные данные позволяют предположить новый режим терапии, в котором свободный лютеин будет заменен цисплатином для увеличения противораковой активности против линии раковых клеток MCF-7. Имеются доказательства, что свободный лютеин обладает более выраженным токсическим эффектом на линии клеток рака груди. Авторы работы [18] предположили, что присутствие двух ортогонально ориентированных пулов лютеина, одного перпендикулярного поверхности мембраны и другого — параллельного плоскости мембраны, в результате приведет к большей стабильности лютеина в биомембранах. Натуральные терапевтические агенты могут быть лучшей заменой в терапии рака, позволяя избежать различных побочных эффектов, вызываемых химиотерапией и радиотерапией. Эта схема лечения может позволять эффективно избегать повреждения нормальных, здоровых клеток в районе вблизи опухолевых клеток [9].

ВЫВОДЫ

Итак, в представленном исследовании показано, что комбинация химиотерапии и высокой дозы (10 Гр) ионизирующей радиации приводит к синергии в отношении ингибирования роста клеток карциномы молочной железы благодаря ин-

дукции цитотоксичности, и данный подход может быть перспективен в терапии молочной железы, несмотря на то, что нужны дополнительные исследования. Вышеизложенные наблюдения указывают на то, что лютеин может быть использован как новый противораковый агент, позволяющий использовать цитотоксичные препараты в более низких дозах, что приведет к более селективной и менее токсичной для организма схеме терапии рака молочной железы у человека. Представленные доказательства эффективности позволяют выдвинуть новую схему терапии, в которой свободный лютеин может быть замещен цисплатином для увеличения противораковой активности против линии раковых клеток MCF-7. Результаты показали, что натуральное вещество (лютеин) может быть альтернативой стандартному фармакологическому вмешательству в лечении карциномы молочной железы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии какого бы то ни было конфликта интересов, относящегося к данной статье

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Tarver, *Cancer facts & figures* (American Cancer Society, Atlanta, 2012).
2. S. V. Talluri, G. Kuppusamy, V. V. S. R. Karri, et al., *Drug Delivery*, **23** (4), 1291 (2016).
3. S. E. Leucuta, *Curr. Clin. Pharmacol.*, **5**, 257 (2010).
4. M. Khvedelidze, T. Mdzinashvili, E. Shekiladze, et al., *J. Liposome Res.*, **25**, 20 (2015).
5. Q. Q. Zhang, J. Chen, D. L. Zhou, et al., *Int. J. Biol. Sci.*, **13** (4), 471 (2017).
6. J. Chen, Z. Zhou, Y. Yao, et al., *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 4760 (2018).
7. L. Cui, S. Her, M. Dunne, et al., *Radiat. Res.*, **187** (2), 147 (2017).
8. N. Sisin, K. Abdul Razak, S. Zainal Abidin, et al., *Int. J. Nanomed.*, **14**, 9941 (2019).
9. R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, K.-W. Yeoh, *Int. J. Med. Sci.*, **9** (3), 193 (2012).
10. B. Yan, M. S. Lu, L. Wang, et al., *Br. J. Nutr.*, **115**, 129 (2016).
11. E. J. Johnson, *Nutr. Rev.*, **72**, 605 (2014).
12. T. Tanaka, M. Shnimizu, and H. Moriwaki, *Molecules*, **17**, 3202 (2012).
13. A. D. Bangham, M. W. Hill, and N. G. A. Miller, In *Methods in Membrane Biology*, ed. by E. D. Karn (Plenum Press, New York, 1974), Vol. 1, pp. 1–68.
14. M. W. Shafaa, H. A. Diehl, and C. Socaciu, *Biophys. Chem.*, **129**, 111 (2007).
15. D. B. Rodriguez-Amaya, *A guide to carotenoid analysis in foods*, Vol. 71 (ILSI Press, Washington, 2001).
16. P. K. Bellamakondi, A. Godavarthi, M. Ibrahim, et al., *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **7** (2), 17 (2014).
17. U. Kätzel, PhD Thesis (Technische Universität, Dresden, 2007), <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:swb:14-1197634640783-66357>.
18. A. Sujak, J. Gabrielska, and W. Grudzecki, *Arch. Biochem. Biophys.*, **371**, 301 (1999).
19. D. Paolino, M. Fresta, P. Sinha, and M. Ferrari, In *Encyclopedia of medical devices and instrumentation*, 2nd ed., Ed. by J. G. Webster (Wiley, New York, 2006), pp. 437–495.
20. L. Plank, C. E. Dahl, and B. R. Ware, *Chem. Phys. Lipids*, **36** (4), 319 (1985).
21. J. W. Klein, B. R. Ware, G. Barclay, and H. R. Petty, *Chem. Phys. Lipids*, **43** (1), 13 (1987).
22. S. Law, W. Lo, S. Pai, and G. The, *Int. J. Pharmaceut.*, **43** (3), 257 (1988).
23. K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, et al., *Biophys. Chem.*, **41** (2), 175 (1991).
24. I. Kolman, N. Pippa, A. Meristoudi, et al., *J. Therm. Analysis Calorimetry*, **123** (3), 2257 (2016).
25. K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1788** (5), 954 (2009).
26. R. Koynova and M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Biomembranes*, **1376** (1), 91 (1998).
27. C. H. Spink, *Methods Cell Biol.*, **84**, 115 (2008).
28. M. W. Shafaa, N. M. Sabra, and R. A. Fouad, *Biopharmaceut. Drug Disposition*, **32** (9), 507 (2011).
29. T. B. Pedersen, T. Kaasgaard, M. Ø. Jensen, et al., *Biophys. J.*, **89** (4), 2494 (2005).
30. A. V. Popova and D. K. Hinch, *Biophys. J.* **93** (4), 1204 (2007).
31. W. I. Gruszecki and K. Strzałka, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis of Disease*, **1740** (2), 108 (2005).
32. N. Fa, S. Ronkart, A. Schanck, et al., *Chem. Phys. Lipids*, **144** (1), 108 (2006).
33. S. S. Bafna, T. Sun, and D. G. Baird, *Polymer*, **34** (4), 708 (1993).
34. A. Blume, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **1**, 64 (1996).
35. F. Severcan, I. Sahin, and N. Kazanci, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1668** (2), 215 (2005).
36. M. M. Mady, M. W. Shafaa, E. R. Abbase, and A. H. Fahim, *Cell biochem. biophys.*, **62** (3), 481 (2012).
37. K. Kushwaha, J. Saxena, B. K. Tripathi, and M. K. Agarwal, *J. BioSci. Biotechnol.*, **3** (3), 253 (2014).
38. M. J. Llansola-Portoles, A. A. Pascal, and B. Robert, *J. Roy. Soc. Interface.*, **14** (135), 20170504 (2017).
39. A. Blume, W. Hubner, and G. Messner, *Biochemistry.*, **27**, 8239 (1988).

40. W. Grudzinski, L. Nierzwicki, R. Welc, et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 1 (2017).
41. P. R.-R. Sowmya, B. P. Arathi, K. Vijay, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **106**, 58 (2017).
42. X. Gong, J. R. Smith, H. M. Swanson, and L. P. Rubin, *Molecules*, **23** (4), 905 (2018).
43. X. D. Zhang, D. Wu, X. Shen, et al., *Biomaterials*, **33** (27), 6408 (2012).

Comparative Cytotoxic Activity of Lutein or Cisplatin Doped with Liposomes against Breast Cancer Cell Lines after Radiotherapy

R.A. Lafta*, M.W. Shafaa*, W.M. Darwish**, and M.S. El-Nagdy*

*Faculty of Natural Sciences, Helwan University, Cairo, 11765 Egypt

**Department of Polymers and Pigments, National Research Centre, Elbohouth St., Dokki, Giza, 12622 Egypt

Interactions of the anticancer drug cisplatin or the antioxidant drug lutein with liposomes as model membranes were characterized. All liposomes had the almost spherical shape, taking into account that liposomes without the said drugs were more evenly dispersed and tended to aggregate less. The mean size diameter of empty liposomal samples was 617.90 ± 75.64 nm, while liposomes loaded with cisplatin, lutein and a cisplatin+lutein combination were 425.60 ± 64.74 nm, 877.85 ± 93.90 nm and 189.91 ± 136.84 nm, respectively, in diameter. The incorporation of cisplatin or lutein into liposome membranes resulted in an increase in the zeta potential values. The lowest zeta potential value was achieved in liposomes containing cisplatin in combination with lutein. The addition of cisplatin to liposomes caused a shift in the melting temperature towards higher values than those of the main peak of empty liposomes indicating a conformational disorder within the phospholipids. Encapsulation of lutein into liposomes resulted in the disappearance of the main characteristic endothermic peak of pure liposomes. FTIR spectroscopy confirmed the interaction of lutein or cisplatin with functional groups in liposomes. In the absence of external gamma-irradiation, the IC_{50} value for free lutein in the cytotoxic assay with MCF-7 treated cells was $10.62 \mu\text{g/ml}$, while free cisplatin showed the IC_{50} value of $41.02 \mu\text{g/ml}$. IC_{50} was $65.84 \mu\text{g/ml}$ and $34.29 \mu\text{g/ml}$ for nanoliposomal lutein and cisplatin, respectively. Using the combined therapy of gamma irradiation at dose rate 5 Gray followed by 10 Gray, the IC_{50} value for free lutein changed from 17.0 to $9.5 \mu\text{g/ml}$. IC_{50} for free cisplatin changed from 51.00 to $43.09 \mu\text{g/ml}$. This study showed that cytotoxic effect of a standard form of lutein is stronger than that of nanoliposomal lutein. The current evidence reveals a new regimen for the treatment during which replacing cisplatin with free lutein increases anticancer activity against the MCF-7 cancer cell line.

Keywords: lutein, cisplatin, liposomes, FTIR spectroscopy, cytotoxicity, gamma irradiation