

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 620.3

ОПТИМИЗАЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

© 2025 г. А. И. Куртова^{а, §}, А. В. Светлакова^{а, §}, О. А. Колесникова^а, В. О. Шипунова^{а, b, *}

^аИнститут биофизики будущего, Московский физико-технический институт,
Московская область, Долгопрудный, 141700 Россия

^бНаучно-исследовательский университет “Сириус”, федеральная территория “Сириус”,
Краснодарский край, 354340 Россия

*e-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

Поступила в редакцию 26.09.2024 г.

После доработки 29.10.2024 г.

Принята к публикации 29.10.2024 г.

Доксорубицин (ДОК) – широко используемый цитотоксический препарат с высокой противоопухолевой активностью, однако его применение сопровождается побочными эффектами. Разработка систем доставки ДОК, способных минимизировать системную токсичность и повысить терапевтическую эффективность, относится к актуальной задаче современной онкологии. Мы исследовали процесс загрузки наночастиц (НЧ) препаратом ДОК в условиях, способствующих выпадению осадка ДОК, для достижения максимальной эффективности сорбции. Для этого были синтезированы стабилизированные полимером магнитные НЧ и изучена эффективность загрузки и образования осадка в зависимости от буфера, концентрации ДОК и времени инкубации с лекарством. Показано, что в растворах с наиболее выраженным образованием осадка ДОК (фосфатный и боратный буферы) загрузка протекала максимально эффективно. В фосфатном буфере при начальной концентрации ДОК 667 мкг/мл нагрузка составляла 886 мг ДОК/г НЧ. Сорбция ДОК на НЧ в этих условиях достигала 85% ДОК уже в течение первого часа, а за 3 ч вырастала до 90%. Высвобождение ДОК из НЧ составило 25% при pH 7.4 и 96% при pH 5.4. Анализ выживаемости клеток ЕМТ-HER2 рака молочной железы показал, что цитотоксичность НЧ, загруженных ДОК в условиях образования осадка, в 8 раз выше, чем НЧ, загруженных при концентрации 20 мкг/мл, – в условиях, когда ДОК не формирует осадка. Полученные результаты позволяют рассматривать НЧ, загруженные в условиях образования осадка ДОК, как эффективную систему доставки, как минимум, не ухудшающую его цитотоксические свойства, но способную значительно увеличить содержание и высвобождение доставляемого лекарства.

Ключевые слова: наночастицы, доксорубицин, онкотерапия, адресная доставка

DOI: 10.31857/S0026898425020108, **EDN:** GFXGJH

Онкологические заболевания относятся к наиболее распространенным, ассоциированным с высокой смертностью патологиям в человеческой популяции. Несмотря на значительный прогресс в области онкологии, химиотерапия по-прежнему входит в большинство схем лечения злокачественных опухолей. Доксорубицин (ДОК), цитотоксический антрациклиновый антибиотик, – один из наиболее широко применяемых химиотерапевтических агентов [1]. ДОК высокоэффективен против широкого спектра злокачественных новообразований, включая карциномы, сар-

комы, рак молочной железы и онкогематологию [2]. Однако клиническое применение этого препарата сопровождается побочными эффектами, основные из которых кардиотоксичность, нефротоксичность, гепатотоксичность и нарушение когнитивных функций [3, 4]. В связи с этим одним из приоритетных направлений в современной онкологии считается разработка систем доставки ДОК, способных минимизировать его негативное влияние на нетрансформированные органы и ткани и одновременно повысить терапевтическую эффективность препарата.

Сокращения: ДОК – доксорубицин; НЧ – наночастицы. § Эти авторы внесли равный вклад.

Для создания систем контролируемой доставки ДОК рассматривается широкий спектр наноразмерных структур на основе липидов, полимеров, белков, углеродных материалов, кремния, серебра, золота, железа и металлоорганических каркасов [5–7]. Наночастицы оксида железа (НЧ) представляют собой перспективную платформу для доставки лекарств благодаря ряду характеристик. Суперпарамагнетизм таких НЧ позволяет использовать их внешнее магнитное поле для направленной доставки лекарственных препаратов преимущественно в опухоль [8–10]. Кроме того, используя магнитно-резонансную томографию, можно визуализировать распределение НЧ магнетита в реальном времени и оценивать эффективность доставки лекарств, а при необходимости оптимизировать схемы противоопухолевой терапии [11, 12]. Для снижения токсичности и повышения устойчивости к окислению и агрегации поверхность НЧ часто покрывают биосовместимыми оболочками [13]. Такая модификация также позволяет увеличить загрузку ДОК, что важно для повышения эффективности химиотерапии [14]. Именно поэтому современные исследования НЧ оксида железа направлены на поиск оптимального покрытия для увеличения эффективности сорбции ДОК [15–17].

Помимо структуры и покрытия НЧ, на противоопухолевую активность препарата также влияют условия его загрузки. ДОК представляет собой амфифильную молекулу, состоящую из гидрофобного антрахинонового кольца и гидрофильного аминоксахара даунозамина [4]. В зависимости от концентрации электролитов и pH в некоторых буферах ДОК подвергается димеризации за счет ковалентной связи, образующейся между аминогруппой одной молекулы и карбонильной группой другой [18]. В отличие

от свободных молекул, димеры ДОК выпадают в осадок, хуже проникают в ядра клеток и обладают меньшей цитотоксичностью [18, 19]. Образование осадка ДОК описано в HEPES-солевом, Tris-солевом и фосфатно-солевом буферах, при этом оно усиливается с увеличением концентрации ДОК, повышением pH и ионной силы раствора [18, 20]. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) чаще других используют в качестве среды для загрузки ДОК на НЧ оксида железа [21–23]. Многие исследователи используют высокие концентрации ДОК для сорбции в ФСБ, а именно 100 мг/л и выше [16, 22, 24, 25], однако влияние образующегося при этом осадка димеров ДОК на сорбцию остается неизвестным. Такой подход может приводить к неточным оценкам загрузки ДОК, заведомо понижая цитотоксичность разрабатываемых лекарственных форм и, как следствие, влияя на эффективность и безопасность систем доставки.

Мы исследовали потенциальную терапевтическую эффективность НЧ оксида железа, загруженных ДОК, в условиях, способствующих образованию димеров. Цель работы заключалась в оптимизации условий загрузки ДОК в НЧ для достижения максимальной эффективности сорбции и высвобождения препарата, а также сохранения его цитотоксичности в отношении опухолевых клеток. Для этого были синтезированы НЧ оксида железа, которые покрывали карбоксиметилдекстраном (КМД) и загружали ДОК в разных условиях (рис. 1а,б). Во-первых, исследована загрузка при высокой концентрации ДОК в различных растворах и установлена высокая эффективность сорбции в буферах, где выпадает осадок ДОК, в частности в фосфатных. Во-вторых, исследована зависимость эффективности сорбции в фосфатном буфере от начальной концентрации ДОК и от времени

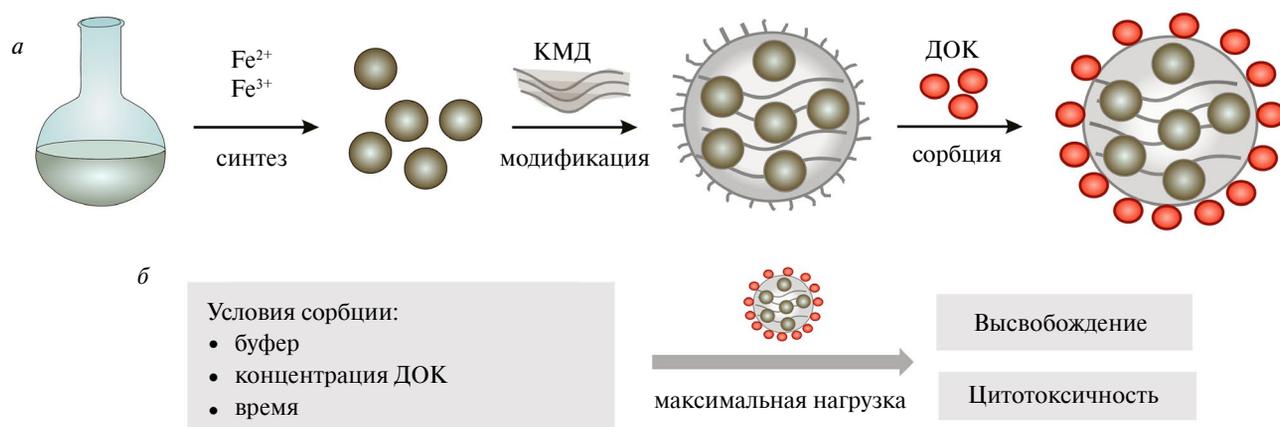


Рис. 1. Дизайн исследования. а — Синтез и модификация НЧ. б — Схема экспериментов по оптимизации условий сорбции и тестированию НЧ с максимальной загрузкой ДОК. КМД — карбоксиметилдекстран.

сорбции. На основе полученных данных выбраны оптимальные условия для обеспечения максимальной загрузки ДОК в НЧ. В-третьих, проанализировали эффективность высвобождения загруженного ДОК из полученных НЧ в условиях нейтрального значения pH и слабокислого, характерного для внутренней среды многих опухолей [26]. Завершающим этапом исследования стала оценка цитотоксичности НЧ, загруженных при различных концентрациях ДОК, на клеточной линии рака молочной железы. Полученные результаты позволяют оценить влияние условий сорбции на эффективность доставки ДОК с помощью НЧ, что представляется важным шагом в разработке лекарственных форм для лечения онкологических заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использованы следующие препараты: фосфат натрия двухосновный, фосфат натрия одноосновный, хлорид калия, хлорид натрия, цитрат натрия, карбоксиметилдекстран (КМД), хлорид железа (III) гексагидрат, сульфат железа (II) гептагидрат, додецилсульфат натрия (SDS), NEPES, борная кислота и тетраборат натрия фирмы “Sigma” (Германия); аммиак, дигидрофосфат калия, сахароза (“Диа-М”, Россия); *n*-гексан, *n*-бутанол, этанол (“Химмед”, Россия); доксорубин гидрохлорид (“ОНОПБ АО”, Россия); культуральная среда DMEM, раствор Версена, L-глутамин, пенициллин-стрептомицин, гентамицин (“ПанЭко”, Россия); фетальная сыворотка крупного рогатого скота (FBS; “HyClone”, США); AbiCell Resazurin Cytotoxicity Assay Kit (ООО “Абисенс”, Россия).

Синтез наночастиц. Синтез магнитных наночастиц (НЧ) проводили микроэмульсионным методом, как описано нами ранее [27]. А именно, 2 г SDS растворяли в смеси 20 мл *n*-гексана и 12 мл *n*-бутанола в круглодонной колбе и тщательно перемешивали. Полученную эмульсию нагревали на водяной бане до 40°C, после чего в нее последовательно добавляли раствор 0.135 г FeCl₃·6H₂O в 1 мл воды II степени очистки (RiOs-DI) и раствор 83.4 мг FeSO₄·7H₂O в 0.6 мл воды RiOs-DI. Эмульсию инкубировали при 40°C в течение 20 мин, повышали температуру водяной бани до 70°C и добавляли 2 мл 25%-ного водного раствора аммиака. Полученную смесь нагревали до 70°C в течение 40 мин и охлаждали до комнатной температуры. Магнитные НЧ очищали от органической смеси с помощью магнитной сепарации, трижды отмывали от эмульсии 96%-ным этанолом и трижды водой RiOs-DI.

Определение размера наночастиц. Размер и морфологию НЧ определяли с использова-

нием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого НЧ помещали на кремниевую пластину на углеродном скотче, высушивали на воздухе и исследовали на микроскопе MAIA3 Tescan (“Tescan”, Чешская Республика) при ускоряющем напряжении 7 кВ. На полученных изображениях с помощью программного обеспечения Fiji [28] измеряли диаметры более 100 НЧ, рассчитывали их средний размер и строили диаграмму распределения размеров.

Форму НЧ оценивали с использованием просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEOL JEM2100Plus (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 70 кВ. Образцы готовили путем нанесения 1 мкл суспензии НЧ на медную сетку, покрытую формваром, и высушивали на воздухе.

Модификация наночастиц. Синтезированные НЧ покрывали КМД. Для этого 15 мкг НЧ разводили в 100 мкл воды MilliQ и добавляли 300 мкл водного раствора КМД (300 г/л). Суспензию НЧ четыре раза поочередно нагревали до 90°C и охлаждали до 4°C, после чего оставляли при комнатной температуре на несколько часов. Покрытые НЧ центрифугировали 10 мин при 10000 g и разводили в 15 мл воды RiOs-DI для получения стокового раствора с концентрацией 1 мг/мл.

Подбор оптимальных условий сорбции доксорубина на наночастицах. Буферные системы. Для изучения влияния среды на эффективность загрузки ДОК на НЧ были приготовлены суспензии из 500 мкг НЧ и 500 мкл следующих растворов: 1) 0.15 М NaCl, 0.01 М фосфатно-солевой буфер (8 г NaCl, 0.2 г KCl, 1.44 г Na₂HPO₄, 0.245 г NaH₂PO₄ на 1 л воды RiOs-DI), pH 7.4 (ФСБ); 2) 0.1 М цитрат натрия, pH 5.0; 3) 0.1 М NEPES, pH 6.0; 4) боратный буфер (24.7 г H₃BO₃, 26.6 г Na₂B₄O₇·10 H₂O на 1 л воды RiOs-DI), pH 8.0; 5) сахароза в воде RiOs-DI (1 г/л); 6) 1 М фосфатный буфер (0.68 г Na₂HPO₄, 0.23 г KH₂PO₄ на 1 л воды RiOs-DI), pH 7.4 (ФБ). В каждую пробирку с суспензией добавляли по 250 мкл раствора ДОК (2 г/л), перемешивали с помощью ультразвука в течение 30 с и оставляли при комнатной температуре на 14 ч, после чего образцы центрифугировали 10 мин при 10 000 g.

Оценка эффективности сорбции. Этот параметр определяли спектрофотометрически по остаточному содержанию ДОК в супернатанте. Интенсивность флуоресценции измеряли на микропланшетном ридере CLARIOstar (“BMG Labtech”, Германия) при $\lambda_{ex} = 500/15$ нм и $\lambda_{em} = 590/30$ нм. Для каждого образца проводили три параллельных измерения. Концентрацию ДОК рассчитывали по калибровочным

кривым, построенным отдельно для каждого буфера. Эффективность сорбции (E_s) рассчитывали по формуле (1):

$$E_s = [(C_0 - C_f)/C_0] \times 100\%, \quad (1)$$

где C_0 – исходная концентрация ДОК, C_f – концентрация ДОК в супернатанте (не связавшегося с НЧ).

Результаты обрабатывали в программе GraphPad Prism v8.0.1. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартного отклонения (SD).

Начальная концентрация ДОК. К суспензии 500 мкг НЧ в 500 мкл ФБ добавляли 250 мкл того же буфера, содержащего 5, 15, 50, 150 или 500 мкг ДОК. Образцы обрабатывали ультразвуком в течение 30 с и оставляли при комнатной температуре на 15 ч. После центрифугирования при 10 000 g измеряли содержание ДОК в супернатанте и рассчитывали эффективность сорбции, как описано выше.

Гидродинамический радиус НЧ до и после сорбции ДОК в образцах с 15 и 500 мкг измеряли на анализаторе размеров частиц Photocor Compact (ООО “Фотокор”, Россия).

Длительность инкубации. Для определения оптимального времени сорбции к суспензии 500 мкг НЧ в 500 мкл ФБ добавляли 250 мкл ДОК (2 г/л). Сорбцию останавливали через разные промежутки времени и определяли эффективность, как описано выше.

Высвобождение доксорубина из наночастиц. Для этого анализа в пробирки объемом 15 мл вносили 500 мкг НЧ и 500 мкл ФБ. К полученной суспензии добавляли 250 мкл раствора ДОК (2 г/л) и инкубировали в течение 15 ч. После центрифугирования в супернатанте измеряли концентрацию ДОК, не связавшегося с НЧ, и рассчитывали количество загруженного препарата, как описано выше. Осадок НЧ ресуспендировали в 15 мл ФСБ с pH 7.4 или 5.4. Пробирки обрабатывали ультразвуком в течение 60 с, после чего через разные временные интервалы центрифугировали 10 мин при 10 000 g и отбирали супернатант. Концентрацию ДОК в супернатанте определяли, как описано выше. Эффективность высвобождения (E_r) рассчитывали по формуле (2):

$$E_r = [(C_s - C_f)/C_s] \times 100\%, \quad (2)$$

где C_s и C_f – концентрация соответственно сорбированного и оставшегося не связанным с НЧ ДОК.

Исследование цитотоксичности НЧ, загруженных при разных концентрациях ДОК.

Для определения цитотоксичности полученных комплексов использовали клетки линии EMT-HER2 рака молочной железы [29]. Клетки культивировали в полной ростовой среде DMEM, содержащей 10% FBS, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 10 мкг/мл ципрофлоксацина и 2 мМ L-глутамин, при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для определения цитотоксичности клетки рассеивали в лунки 96-луночного планшета (4 × 10³/лунка) и инкубировали в тех же условиях в течение 4 ч. Загруженные и не загруженные ДОК НЧ, а также свободный ДОК разводили в культуральной среде в различных концентрациях и добавляли в лунки с клетками. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с клетками, в которые вносили только культуральную среду. После 48 ч инкубации среду из лунок заменяли на резазуринсодержащий препарат AbiCell Resazurin Cytotoxicity Assay Kit, разведенный в 100 раз ФСБ согласно рекомендации производителя, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 1.5 ч. Интенсивность флуоресценции измеряли на микропланшетном анализаторе CLARIOstar (“BMG Labtech”) при $\lambda_{ex} = 550/15$ нм и $\lambda_{em} = 590/20$ нм. Для каждого образца проводили 6 параллельных измерений.

Построение гистограмм выживаемости клеток и статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism v8.0.1. Жизнеспособность клеток рассчитывали в процентах от числа контрольных клеток. Цитотоксичность оценивали по значению полу-максимальной цитотоксической концентрации (CC₅₀), которое отражает концентрацию препарата, при которой происходит гибель половины клеток. Величину CC₅₀ определяли с помощью трехпараметрической нелинейной аппроксимации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве платформы для доставки ДОК к клеткам-мишеням использовали магнитные НЧ, синтезированные микроэмульсионным методом, которые, как показано нами ранее [27, 30], эффективно работают как системы адресной доставки *in vitro* и *in vivo*. По результатам электронной микроскопии, СЭМ и ПЭМ, синтезированные НЧ представляют собой кристаллы магнетита сферической формы (рис. 2а,б). Размер НЧ, определенный по изображениям СЭМ и ПЭМ, варьирует от 19 до 32 нм. Согласно гистограмме распределения размеров, средний диаметр немодифицированных НЧ равен 25 нм (рис. 2в).

По результатам исследования загрузки НЧ целевым препаратом в зависимости от состава буфера (рис. 2*з*) самая высокая эффективность сорбции за 14 ч инкубации обнаружена в боратном буфере (98%; 981 мг ДОК/г НЧ) и немного ниже в двух фосфатсодержащих: ФСБ и ФБ (~88%; соответственно 878.7 и 875.1 мг ДОК/г НЧ), — несмотря на их различия по молярности и ионной силе. Эффективность сорбции в остальных растворах была значительно ниже, составив около 38% в цитрате натрия, 28% в HEPES, 20% в NaCl и сахарозе и 12% в воде. Наблюдалась прямая зависимость между количеством осадка ДОК и эффективностью сорбции. В растворах с наиболее выраженным осаждением ДОК (цитратный, оба фосфатных и боратный буферы) сорбция протекала наиболее эффективно (рис. 2*д*). Для последующих экспериментов в качестве среды для сорбции был выбран ФБ.

Влияние начальной концентрации ДОК на эффективность сорбции анализировали, варьируя этот параметр при фиксированном количестве НЧ в ФБ. При 15-часовой инкубации эффективность сорбции с увеличением кон-

центрации ДОК (рис. 3*а*) немного повышалась (с 83.3% для 6.67 мкг/мл до 89% для 20 мкг/мл), а потом снижалась (75% при 66.7 мкг/мл и 52% при 200 мкг/мл). Дальнейшее увеличение концентрации ДОК до 667 мкг/мл вновь привело к увеличению эффективности сорбции до 88%. Параллельно с этим масса ДОК, загруженная на одну НЧ, возрастала с увеличением начальной концентрации лекарственного препарата (рис. 3*б*). Наиболее значительный прирост наблюдали в диапазоне концентраций между 200 и 667 мкг/мл, где масса загруженного ДОК увеличилась со 157 до 886 мг/г НЧ. Что касается гидродинамического радиуса НЧ, показано, что он не изменился после инкубации с ДОК в концентрации 20 мкг/мл и составлял около 120 нм (рис. 3*в*). При увеличении начальной концентрации ДОК до 667 мкг/мл гидродинамический радиус НЧ увеличивался до 465 нм (рис. 3*в*). При сорбции в диапазоне концентраций между 200 и 667 мкг/мл регистрировали активное образование осадка ДОК (рис. 3*з*), что совпадало с появлением второго пика эффективности сорбции и резким ростом гидродинамического радиуса и массы ДОК на НЧ. Как видно на рис. 3*д*, ДОК, загруженный

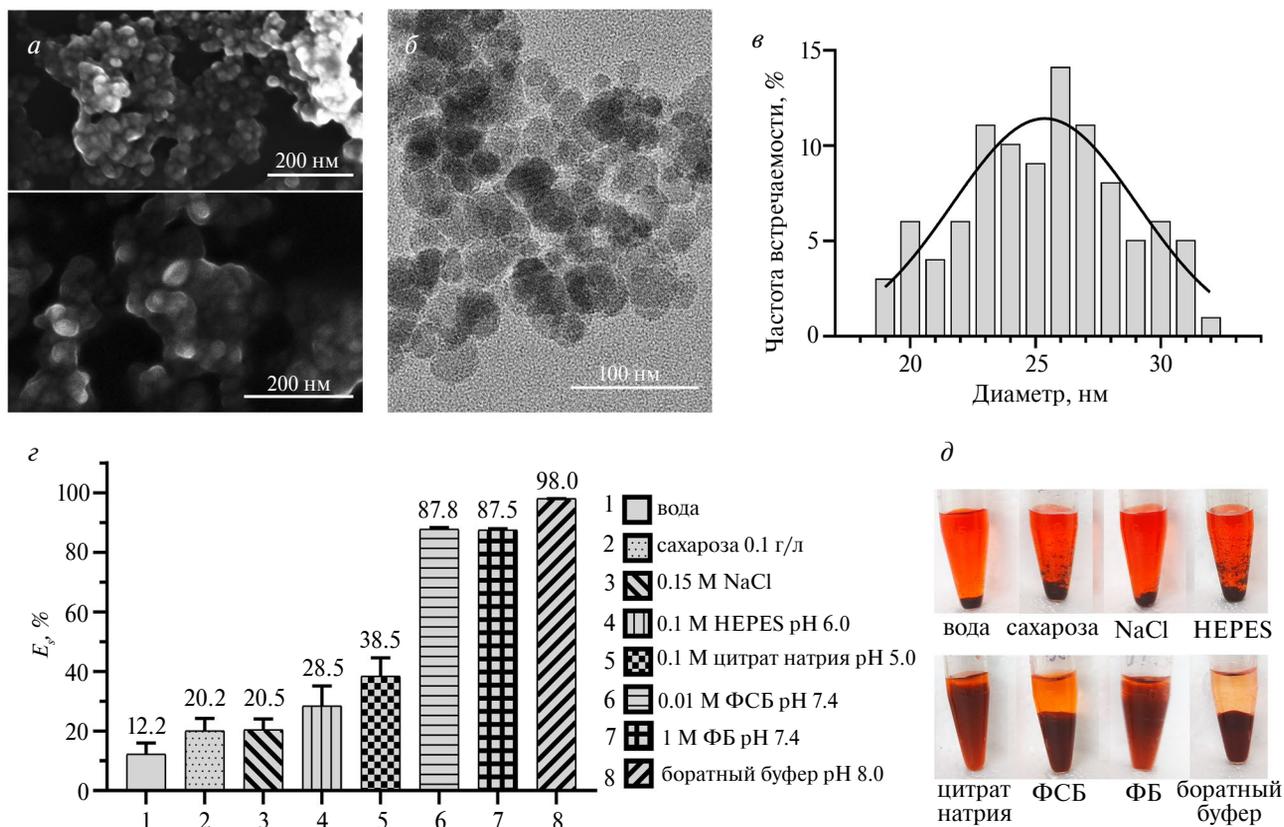


Рис. 2. Характеристика полученных магнитных наночастиц. *а, б* — Микрофотографии немодифицированных НЧ, полученные с помощью СЭМ (*а*) и ТЭМ (*б*). *в* — Гистограмма распределения НЧ по размеру по результатам обработки микроэлектронных фотографий. *з* — Эффективность сорбции ДОК на НЧ в разных буферах. *д* — Фотографии пробирок после сорбции ДОК на НЧ в разных буферах.

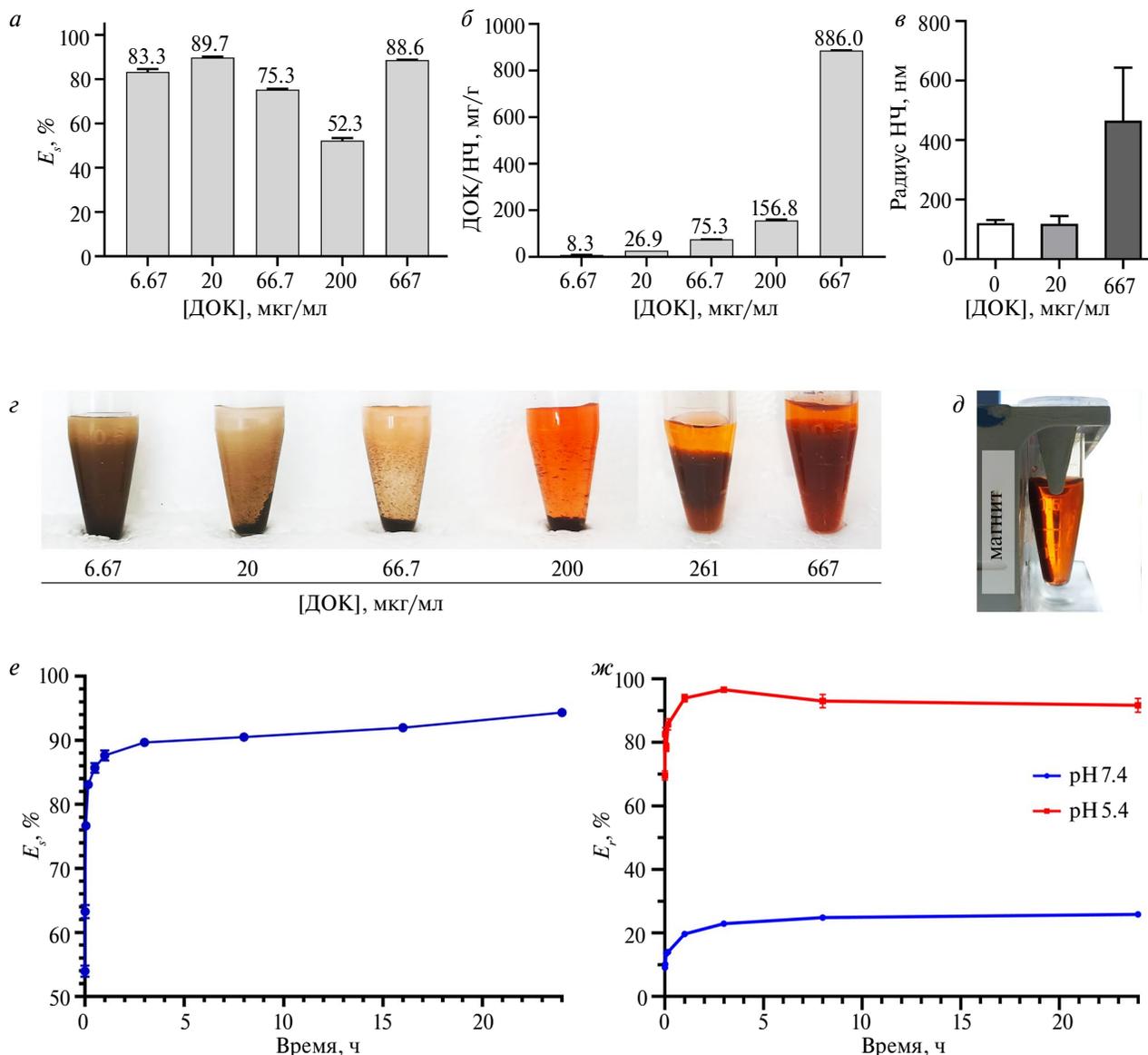


Рис. 3. Сорбция ДОК на наночастицах в ФБ. *а* – Зависимость эффективности сорбции от начальной концентрации ДОК. *б* – Масса сорбированного ДОК при разных начальных концентрациях ДОК. *в* – Гидродинамический радиус НЧ до сорбции и после сорбции в разных концентрациях ДОК. *г* – Фотографии пробирок после 15 ч сорбции ДОК с разными начальными концентрациями на НЧ (без обработки на ультразвуковой бане). *д* – Перемещение НЧ с осадком ДОК (см. 3г, [ДОК] = 667 мкг/мл) на боковую стенку пробирки под действием магнита. *е* – Зависимость эффективности сорбции от времени. *ж* – Эффективность высвобождения ДОК из НЧ в ФСБ при pH 7.4 и 5.5.

в условиях образования осадка, оставался связанным с НЧ после сепарации на магнитном штативе.

Исследование динамики сорбции для эксперимента с максимальной концентрацией ДОК (667 мкг/мл) в ФБ показало, что эффективность сорбции препарата на НЧ уже за первый час достигала 85% и выходила на плато в районе 88% через 3 ч инкубации (рис. 3е). Заметим, что уже через 30 с инкубации в НЧ загружалось 54% от начального количества ДОК в растворе, а за 24 ч эффективность сорбции достигала 94%.

Кинетику высвобождения загруженного на НЧ лекарственного препарата (начальная концентрация ДОК 667 мкг/мл) исследовали в ФСБ при двух значениях pH: физиологическом (7.4) и кислом (5.4). На рис. 3ж представлены результаты этого анализа. Как видно, при pH 7.4 максимальное высвобождение ДОК не превышало 25% от сорбированного на НЧ, причем достигало этого значения только через 3 ч. Тогда как при pH 5.4 93–96% ДОК было в растворе уже через 1 ч. Интересно, что в течение первых 10 мин с НЧ высвободилось 14% загруженного ДОК в нейтральном pH и 85% – в кислом.

При исследовании цитотоксичности НЧ выявлено, что для незагруженных НЧ выживаемость клеток линии ЕМТ-HER2 начинала снижаться только при концентрации частиц 8 мкг/мл и выше (рис. 4а). Значение CC_{50} для частиц, проинкубированных с 667 мкг/мл ДОК и, как показано выше, максимально загруженных препаратом, было минимальным и составило 0.8 мкг/мл НЧ (рис. 4б); для остальных НЧ значения CC_{50} распределились в соответствии с количеством загруженного в них ДОК.

Интересно отметить, что если представить данные в виде концентрации загруженного на НЧ ДОК, то наибольшая цитотоксичность зарегистрирована для тех, которые загружены при концентрации ДОК 20 мкг/мл (рис. 4в). Для этого образца величина CC_{50} в отношении клеток линии ЕМТ-HER2 составила 0.20 мкг/мл ДОК, что в несколько раз меньше, чем для НЧ, загруженных ДОК при более высоких концентрациях, и, что особенно важно, соответствует CC_{50} свободного ДОК (рис. 4г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования показано, что образование осадка ДОК при высоких концентрациях препарата в растворе может существенно повысить эффективность загрузки НЧ оксида железа. В частности, в фосфатном буфере при концентрации ДОК 667 мкг/мл была достигнута загрузка 886 мкг ДОК/г НЧ, что соответствует 88% от начального количества ДОК. Известно, что емкость НЧ по загрузке ДОК зависит от их покрытия. В большинстве случаев при использовании ФСБ загрузка составляла от 30 до 70 мкг ДОК/г НЧ [17, 21, 22, 24]. Модификация НЧ ионными полимерными покрытиями, такими как КМД, полистиролсульфонат (ПСС) и полиэтиленмин (ПЭИ), позволяет повысить эффективность загрузки ДОК [31]. Например, для НЧ оксида железа, модифицированных ПЭИ и ПСС, была достигнута загрузка 691 и 325 мкг ДОК/г НЧ соответственно [17]. Однако эти значения значительно ниже, чем полученные в этом исследовании – с использованием буферов, в которых происходило образование

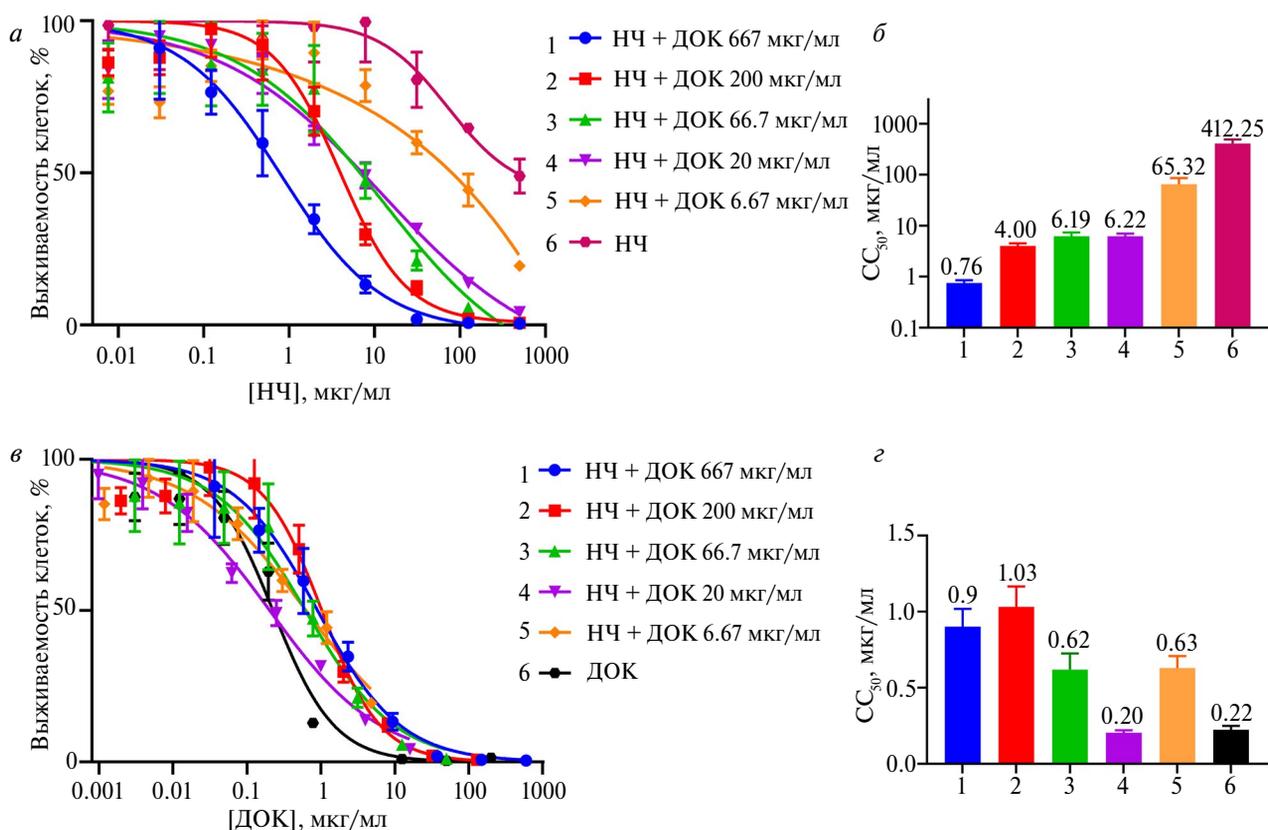


Рис. 4. Цитотоксичность НЧ после сорбции ДОК в разных концентрациях. *а* – Зависимость выживаемости клеток от концентрации загруженных при разных начальных концентрациях ДОК (1–5) и незагруженных (6) НЧ. *б* – Значения CC_{50} для НЧ, загруженных при разных концентрациях ДОК (1–6 из *а*). *в* – Зависимость выживаемости клеток от концентрации ДОК, загруженного в НЧ при разных начальных концентрациях (1–5), и свободного ДОК. *г* – Значения CC_{50} для ДОК, загруженного на НЧ при разных концентрациях (1–6 из *в*).

осадка ДОК. Важно отметить, что даже в воде, где осадок ДОК не образуется, загрузка синтезированных НЧ составила 123 мг ДОК/г НЧ. Это свидетельствует о том, что НЧ, покрытые отрицательно заряженным КМД, обладают высокой сорбционной активностью в отношении ДОК. Полученная нами эффективность загрузки ДОК в воде (123 мг ДОК/г НЧ) превосходит зарегистрированную N. Singh с соавт. [32] для такой же системы: ДОК и НЧ оксида железа (32 мг ДОК/г НЧ). Образование осадка ДОК повышалось при щелочном pH [18]. Максимальной сорбции удалось достичь в боратном буфере, где она составила 981 мг ДОК/г НЧ, что немного превосходит показатели, полученные E. Ковригиной (E. Kovrigina) с соавт. [33] (868 мг ДОК/г НЧ). Это подтверждает предположение, что образование осадка влияет на эффективность сорбции. Для дальнейшего анализа мы выбрали 1 М фосфат, pH 7.4 (ФБ), в котором загрузка НЧ также была высокоэффективной. Для *in vivo* исследований предпочтительнее использовать НЧ, загруженные в нейтральных условиях, так как загрузка в щелочной среде может привести к преждевременному высвобождению ДОК при их введении в кровяное русло.

Исследование зависимости эффективности загрузки ДОК от его начальной концентрации выявило наличие двух максимумов: при 20 и 667 мкг/мл. Согласно литературным данным, загрузка ДОК на НЧ оксида железа в ФСБ при концентрации 20 мкг/мл варьирует от 36.8 до 691 мг ДОК/г НЧ в зависимости от покрытия НЧ [17, 21]. Нами показано, что при этой концентрации осадок ДОК не образуется и в НЧ загружается всего 27 мг ДОК/г НЧ. Благодаря амфифильным свойствам молекулы ДОК могут сорбироваться на НЧ за счет электростатических, вандерваальсовых взаимодействий и водородных связей [34]. При увеличении концентрации ДОК происходит насыщение мест связывания, что снижает эффективность сорбции. Ранее показано, что использование концентраций ДОК от 100 до 250 мкг/мл не приводит к значительному увеличению загрузки НЧ, которая, как правило, не превышает 100 мг ДОК/г НЧ [16, 22, 24, 25]. Нами показано, что при 200 мкг/мл ДОК загрузка НЧ составила 156 мг ДОК/г НЧ. При высоких концентрациях ДОК (667 мкг/мл) наблюдалось образование осадка димеров, которые осаждались на поверхности НЧ [18, 20]. В этом случае насыщение достигается только при исчерпании димеров в растворе, что приводит к изменению механизма сорбции и появлению второго пика связывания ДОК с НЧ. Этот механизм повышения загрузки отличается высокой эффективностью и простотой, что важно

для клинического применения. Еще один важный параметр — скорость загрузки. В условиях образования осадка ДОК загрузка достигает 850 мг ДОК/г НЧ уже за первый час сорбции, а для НЧ оксида железа среднее время загрузки в ФСБ составляет 24 ч [16, 22–24]. Таким образом, проведенные исследования подтверждают, что использование высоких концентраций ДОК в фосфатном буфере, приводящее к образованию осадка, является перспективным подходом для повышения эффективности загрузки НЧ.

Эксперименты с высвобождением ДОК в кислой и нейтральной среде показали, что НЧ, загруженные ДОК в условиях образования осадка, способны эффективно высвободить лекарственное вещество в кислой среде, имитирующей микроокружение опухоли. Внутренняя среда многих опухолей характеризуется более кислым pH, чем здоровые ткани [26]. Именно поэтому в системах доставки ДОК часто используют pH-зависимый механизм высвобождения, обеспечивающий выход терапевтического соединения преимущественно внутри опухоли [35–37]. Нами показано, что выход ДОК из НЧ, загруженных в ФБ при 667 мкг/мл, в нейтральных условиях составляет 25%, а в условиях слабокислого pH увеличивается до 96%. Эти результаты показывают, что чем выше концентрация ДОК в процессе загрузки НЧ, тем больше максимальный уровень высвобождения ДОК в условиях кислого pH. Так, V. Khabibullin и др. [17] сообщали, что из НЧ с ДОК, загруженных в концентрации 20 мкг/мл в ФСБ, высвобождалось менее 7% препарата при нейтральном pH и 30% в кислой среде (pH 5.0). А при более высокой начальной концентрации ДОК, 167 мкг/мл, X. Liu и др. [22] давали следующие цифры: 20 и 93% [22], — с которыми согласуются полученные нами результаты. Эффективное высвобождение ДОК с НЧ, загруженных при высоких концентрациях препарата, скорее всего, связано с механизмом загрузки, отличным от того, который “работает” при низких концентрациях. По-видимому, во время сорбции при высоких концентрациях ДОК образуются димеры, которые выпадают в осадок на НЧ. В кислых условиях димеры ДОК распадаются [38], что может обеспечивать высвобождение лекарства из осадка, сформированного на НЧ. Таким образом, сорбция при высоких концентрациях ДОК способствует высвобождению лекарственного препарата в кислой среде, имитирующей условия микроокружения опухоли.

В экспериментах по выживаемости клеток EMT-HER2 рака молочной железы, обработанных НЧ, показано, что цитотоксическое действие частиц растет по мере увеличения concentra-

ции ДОК, при которой происходила их загрузка. Ранее на линии клеток А549 рака легкого показано, что димеры ДОК менее токсичны для них ($CC_{50} = 1.17$ мкг/мл), чем свободные молекулы ($CC_{50} = 0.25$ мкг/мл) [18]. Также димеры ДОК хуже проникают в ядра клеток, что ограничивает их цитотоксическое действие [18, 19]. Нами показано, что НЧ, загруженные при концентрации ДОК 667 мкг/л, обладают меньшей цитотоксичностью, чем загруженные при 20 мкг/л, что может быть следствием высвобождения ДОК в виде димеров. Однако эта разница нивелируется количеством загруженного при 667 мкг/мл ДОК, которое позволяет снизить терапевтическую дозу НЧ в 8 раз по сравнению с загруженными при 20 мкг/мл. В эксперименте по выживаемости клеток линии А549 также была зарегистрирована высокая цитотоксичность НЧ оксида железа, загруженных в боратном буфере при концентрации ДОК 1 мкг/мл, то есть 1 г/л ($CC_{50} = 0.4$ мкг/мл) [33]. Это подтверждает, что НЧ, загруженные в условиях образования осадка димеров ДОК, обладают высокой цитотоксичностью. В настоящее время препараты на основе димеров активно разрабатываются как системы доставки лекарств, не содержащие носителей [39]. В рамках таких систем димеры ДОК используют как самособирающиеся НЧ с рН-зависимым высвобождением мономера ДОК в тканях опухолей [38, 40]. Таким образом, использование димеров ДОК при загрузке НЧ — перспективный подход для повышения эффективности онкотерапии, который позволяет увеличить цитотоксичность при одновременном снижении эффективной терапевтической дозы.

На основании полученных результатов можно говорить о разработке новой системы загрузки ДОК. Ее использование позволяет эффективно загружать ДОК на НЧ в условиях образования осадка препарата, что повышает концентрацию лекарства на НЧ и потенциально увеличивает эффективность химиотерапии. Кроме того, разработанная система обеспечивает обильное высвобождение ДОК в среде, имитирующей микроокружение опухоли, что важно для направленной доставки лекарственных средств к опухолевым клеткам и снижения побочных эффектов. Важно отметить, что загрузка лекарства в данную систему отличается простотой исполнения, а это немаловажный фактор для технологического процесса в перспективе. Дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию разработанной системы доставки и изучение ее эффективности в экспериментах *in vivo*.

Исследование поддержано Минобрнауки Российской Федерации (соглашение 075-03-2024-117, проект FSMG-2023-0015).

В данной работе не использованы животные в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Куртова А.И., Светлакова А.В., Колесникова О.А., Шипунова В.О. разработали поэтапный план исследования и провели все эксперименты; Куртова А.И. и Шипунова В.О. участвовали в написании статьи; все авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов и их интерпретации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tilsed C.M., Fisher S.A., Nowak A.K., Lake R.A., Lesterhuis W.J. (2022) Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Front. Oncol.* **12**, 960317. doi: 10.3389/fonc.2022.960317
2. Kciuk M., Gielecińska A., Mujwar S., Kołat D., Kałuzińska-Kołat Ż., Celik I., Kontek R. (2023) Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells.* **12**(4), 659. doi: 10.3390/cells12040659
3. Al-Malky H.S., Al Harthi S.E., Osman A.-M.M. (2020) Major obstacles to doxorubicin therapy: cardiotoxicity and drug resistance. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **26**, 434–444. doi: 10.1177/1078155219877931
4. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I. (2009) Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr. Med. Chem.* **16**, 3267–3285. doi: 10.2174/092986709788803312
5. Kanwal U., Irfan Bukhari N., Ovais M., Abass N., Hussain K., Raza A. (2018) Advances in nanodelivery systems for doxorubicin: an updated insight. *J. Drug Target.* **26**, 296–310. doi: 10.1080/1061186X.2017.1380655
6. Liu Y., Yang G., Jin S., Xu L., Zhao C.-X. (2020) Development of high-drug-loading nanoparticles. *Chempluschem.* **85**, 2143–2157. doi: 10.1002/cplu.202000496
7. Zeng W., Luo Y., Gan D., Zhang Y., Deng H., Liu G. (2023) Advances in doxorubicin-based nanodrug delivery system in triple negative breast cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, 1271420. doi: 10.3389/fbioe.2023.1271420
8. Estelrich J., Escribano E., Queralt J., Busquets M.A. (2015) Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 8070–8101. doi: 10.3390/ijms16048070
9. Kakar S., Batra D., Singh R., Nautiyal U. (2013) Magnetic microspheres as magical novel drug delivery system: a review. *J. Acute Disease.* **2**, 1–12. doi: 10.1016/S2221-6189(13)60087-6
10. Palanisamy S., Wang Y.-M. (2019) Superparamagnetic iron oxide nanoparticulate system: synthesis, targeting, drug delivery and therapy in cancer. *Dalton Trans.* **48**, 9490–9515. doi: 10.1039/C9DT00459A

11. Canese R., Vurro F., Marzola P. (2021) Iron oxide nanoparticles as theranostic agents in cancer immunotherapy. *Nanomaterials* (Basel). **11**(8), 1950. doi: 10.3390/nano11081950
12. Tong S., Zhu H., Bao G. (2019) Magnetic iron oxide nanoparticles for disease detection and therapy. *Mater. Today* (Kidlington). **31**, 86–99. doi: 10.1016/j.mattod.2019.06.003
13. Zhu N., Ji H., Yu P., Niu J., Farooq M.U., Akram M.W., Udego I.O., Li H., Niu X. (2018) Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomaterials* (Basel). **8**(10), 810. doi: 10.3390/nano8100810
14. Doan L., Nguyen L.T., Nguyen N.T.N. (2023) Modifying superparamagnetic iron oxides nanoparticles for doxorubicin delivery carriers: a review. *J. Nanopart. Res* **25**(4), 73. doi: 10.1007/s11051-023-05716-3
15. Demin A.M., Vakhrushev A.V., Valova M.S., Korolyova M.A., Uimin M.A., Minin A.S., Pozdina V.A., Byzov I.V., Tumashov A.A., Chistyakov K.A., Levit G.L., Krasnov V.P., Charushin V.N. (2022) Effect of the silica-magnetite nanocomposite coating functionalization on the doxorubicin sorption/desorption. *Pharmaceutics*. **14**(11), 2271. doi: 10.3390/pharmaceutics14112271
16. Eslami P., Albino M., Scavone F., Chiellini F., Morelli A., Baldi G., Cappiello L., Doumet S., Lorenzi G., Ravagli C., Caneschi A., Laurenzana A., Sangregorio C. (2022) Smart magnetic nanocarriers for multi-stimuli on-demand drug delivery. *Nanomaterials* (Basel). **12**(3), 303. doi: 10.3390/nano12030303
17. Khabibullin V.R., Chetyrkina M.R., Obydenny S.I., Maksimov S.V., Stepanov G.V., Shtykov S.N. (2023) Study on doxorubicin loading on differently functionalized iron oxide nanoparticles: implications for controlled drug-delivery application. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(5), 4480. doi: 10.3390/ijms24054480
18. Yamada Y. (2020) Dimerization of doxorubicin causes its precipitation. *ACS Omega*. **5**, 33235–33241. doi: 10.1021/acsomega.0c04925
19. Bofill-Bonet C., Gil-Vives M., Artigues M., Hernández M., Borrós S., Fornaguera C. (2023) Fine-tuning formulation and biological interaction of doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles via electrolyte concentration modulation. *J. Mol. Liquids*. **390**, 122986. doi: 10.1016/j.molliq.2023.122986
20. Menozzi M., Valentini L., Vannini E., Arcamone F. (1984) Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* **73**, 766–770. doi: 10.1002/jps.2600730615
21. Cai W., Guo M., Weng X., Zhang W., Chen Z. (2019) Adsorption of doxorubicin hydrochloride on glutaric anhydride functionalized Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **98**, 65–73. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.145
22. Liu X., Wang C., Wang X., Tian C., Shen Y., Zhu M. (2021) A dual-targeting Fe₃O₄@C/ZnO-DOX-FA nanoplatform with pH-responsive drug release and synergetic chemo-photothermal antitumor *in vitro* and *in vivo*. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **118**, 111455. doi: 10.1016/j.msec.2020.111455
23. Nogueira J., Soares S.F., Amorim C.O., Amaral J.S., Silva C., Martel F., Trindade T., Daniel-da-Silva A.L. (2020) Magnetic driven nanocarriers for pH-responsive doxorubicin release in cancer therapy. *Molecules*. **25**(2), 333. doi: 10.3390/molecules25020333
24. Hernandez E.P., Lazarin-Bidóia D., Bini R.D., Nakamura C.V., Cótica L.F., de Oliveira Silva Lautenschlager S. (2023) Doxorubicin-loaded iron oxide nanoparticles induce oxidative stress and cell cycle arrest in breast cancer cells. *Antioxidants* (Basel). **12**, 237. doi: 10.3390/antiox12020237
25. Kayal S., Ramanujan R.V. (2010) Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C*. **30**, 484–490. doi: 10.1016/j.msec.2010.01.006
26. Shin S., Lee J., Han J., Li F., Ling D., Park W. (2022) Tumor microenvironment modulating functional nanoparticles for effective cancer treatments. *Tissue Eng. Regen. Med.* **19**, 205–219. doi: 10.1007/s13770-021-00403-7
27. Shipunova V.O., Kolesnikova O.A., Kotelnikova P.A., Soloviev V.D., Popov A.A., Proshkina G.M., Nikitin M.P., Deyev S.M. (2021) Comparative evaluation of engineered polypeptide scaffolds in HER2-targeting magnetic nanocarrier delivery. *ACS Omega*. **6**, 16000–16008. doi: 10.1021/acsomega.1c01811
28. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. **9**, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
29. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. (2023) Targeted two-step delivery of oncotheranostic nano-PLGA for HER2-positive tumor imaging and therapy *in vivo*: improved effectiveness compared to one-step strategy. *Pharmaceutics*. **15**, 833. doi: 10.3390/pharmaceutics15030833
30. Kolesnikova O.A., Komedchikova E.N., Zvereva S.D., Obozina A.S., Dorozh O.V., Afanasev I., Nikitin P.I., Mochalova E.N., Nikitin M.P., Shipunova V.O. (2024) Albumin incorporation into recognising layer of HER2-specific magnetic nanoparticles as a tool for optimal targeting of the acidic tumor microenvironment. *Heliyon*. **10**, e34211. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e34211
31. Iureva A.M., Nikitin P.I., Tereshina E.D., Nikitin M.P., Shipunova V.O. (2024) The influence of various polymer coatings on the *in vitro* and *in vivo* properties of PLGA nanoparticles: comprehensive study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **201**, 114366. doi: 10.1016/j.ejpb.2024.114366

32. Singh N., Nayak J., Sahoo S.K., Kumar R. (2019) Glutathione conjugated superparamagnetic Fe₃O₄-Au core shell nanoparticles for pH controlled release of DOX. *Mater. Sci. Eng. C*. **100**, 453–465. doi: 10.1016/j.msec.2019.03.031
33. Kovrigina E., Chubarov A., Dmitrienko E. (2022) High drug capacity doxorubicin-loaded iron oxide nanocomposites for cancer therapy. *Magnetochemistry*. **8**, 54. doi: 10.3390/magnetochemistry8050054
34. Sturgeon R.J., Schulman S.G. (1977) Electronic absorption spectra and protolytic equilibria of doxorubicin: direct spectrophotometric determination of microconstants. *J. Pharm. Sci.* **66**, 958–961. doi: 10.1002/jps.2600660714
35. Minati L., Antonini V., Dalla Serra M., Speranza G., Enrichi F., Riello P. (2013) pH-activated doxorubicin release from polyelectrolyte complex layer coated mesoporous silica nanoparticles. *Microporous Mesoporous Mater.* **180**, 86–91. doi: 10.1016/j.micromeso.2013.06.016
36. Wang Y., Yang S.-T., Wang Y., Liu Y., Wang H. (2012) Adsorption and desorption of doxorubicin on oxidized carbon nanotubes. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **97**, 62–69. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.013
37. Zhao N., Woodle M.C., Mixson A.J. (2018) Advances in delivery systems for doxorubicin. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **9**(5), 519. doi: 10.4172/2157-7439.1000519
38. Li J., Li X., Pei M., Liu P. (2020) Acid-labile anhydride-linked doxorubicin-doxorubicin dimer nanoparticles as drug self-delivery system with minimized premature drug leakage and enhanced anti-tumor efficacy. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **192**, 111064. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111064
39. Xue P., Wang J., Han X., Wang Y. (2019) Hydrophobic drug self-delivery systems as a versatile nanoplatform for cancer therapy: a review. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **180**, 202–211. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.04.050
40. Yang C., Liu P. (2024) Regulating drug release performance of acid-triggered dimeric prodrug-based drug self-delivery system by altering its aggregation structure. *Molecules*. **29**(15), 3619. doi: 10.3390/molecules29153619

Optimization of Cytotoxic Properties of Magnetic Nanoparticle-Based Doxorubicin Delivery System

© 2025 A. I. Kurtova¹, A. V. Svetlakova¹, O. A. Kolesnikova¹, V. O. Shipunova^{1, 2, *}

¹*Institute of Future Biophysics, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

²*Nanobiomedicine Division, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar region, 354340 Russia*

*e-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

Doxorubicin (DOX) is a widely used cytotoxic drug with high antitumor activity, but its use is accompanied by side effects. The development of DOX delivery systems that can minimize systemic toxicity and increase therapeutic efficacy is an urgent task in modern oncology. We investigated the process of loading nanoparticles (NPs) with DOX under conditions that promote DOX precipitation in order to achieve maximum sorption efficiency. For this purpose, polymer-stabilized magnetic NPs were synthesized, and the efficiency of loading and precipitation was studied in dependence on the buffer, DOX concentration, and incubation time with the drug. It was shown that in solutions with the most pronounced DOX precipitate formation (phosphate and borate buffers) loading proceeded maximally efficiently. In a phosphate buffer at an initial DOX concentration of 667 µg/mL, the load was 886 mg DOX/g NPs. The sorption of DOX on NPs under these conditions reached 85% of DOX already within the first hour, and increased to 90% within 3 h. The release of DOX from NPs was 25% at pH 7.4 and 96% at pH 5.4. The survival analysis of EMT-HER2 breast cancer cells showed that the cytotoxicity of NPs loaded with DOX under precipitation conditions was 8 times higher than that of NPs loaded at a concentration of 20 µg/mL, i.e. when DOX does not form a precipitate. This allows us to consider NPs loaded with precipitated DOX as an effective delivery system that, without impairing the cytotoxic properties of the drug, can significantly increase its content and release in tumor cells.

Keywords: nanoparticles, doxorubicin, oncotherapy, targeted delivery