

ОБ УСИЛЕНИИ АПИГЕНИНОМ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЦИСПЛАТИНА

М.А. Борщевская, В.Г. Артюхов, И.А. Колтаков

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 11.06.2025 г.

Аннотация. Одной из ключевых проблем современной химиотерапии онкологических заболеваний является низкая селективность цитостатиков, с которой связано развитие тяжелых побочных эффектов. Перспективным направлением для повышения эффективности и безопасности лечения является использование систем направленной доставки, в частности, липосомальных форм препаратов. В связи с чем, целью данного исследования стала оценка возможности усиления цитотоксического и генотоксического действия липосомальной формы цисплатина при его комбинировании с растительным флавоноидом - апигенином.

В качестве модельных ктеток-мишеней были использованы перитонеальные макрофаги мышей линии CD-1. Липосомы, нагруженные цисплатином (0,5 мг/мл) и апигенином в концентрациях 5, 10, 20 и 50 мкМ, получали методом дегидратации/регидратации; воздействие на клетки проводили в течение 1 часа. Для анализа степени повреждения клеток и их генома использовали метод проточной цитофлуориметрии (оценка жизнеспособности и метаболической активности с помощью красителей Guava ViaCount и акридинового оранжевого) и метод ДНК-комет.

Результаты продемонстрировали, что комбинированная липосомальная форма обладает значительно более выраженным цитотоксическим действием по сравнению с липосомами, содержащими только цисплатин. Добавление апигенина во всех тестируемых концентрациях вызывало синергичный эффект: концентрация жизнеспособных клеток снижалась до $1 \cdot 10^8$ /л (против $1,4 \cdot 10^9$ /л для цисплатина), а их жизнеспособность падала более чем в 2 раза (до 35,9–49%). Метод ДНК-комет подтвердил дозозависимое усиление генотоксического действия: содержание ДНК в «голове» кометы и момент хвоста статистически значимо снижались с ростом концентрации апигенина.

Таким образом, исследование *in vitro* доказало, что инкапсуляция цисплатина в липосомы в комбинации с апигенином существенно повышает его цитостатическую активность и усиливает повреждение генома клеток-мишеней. Полученные данные обосновывают перспективность дальнейшего изучения подобных комбинированных липосомальных систем для разработки более эффективных и селективных стратегий противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: цисплатин, апигенин, адресная доставка лекарств, противоопухолевая терапия

Онкологические заболевания остаются одной из главных проблем современной медицины и биологии, поскольку требуют комплексного лечения, которое бывает затруднено из-за тяжести состояния пациентов и не всегда приводит к благоприятным исходам. Проведение лекарственной химиотерапии зачастую может быть сильно ограничено. Это связано с неселективным действием используемых препаратов, активные вещества которых, равномерно распределяясь в организме, поражают как опухолевые, так и здоровые клетки и вызывают развитие серьезных побочных эффектов [1-2]. Поэтому перспективными направлениями становится разработка более селективных

лекарственных препаратов или повышение специфичности взаимодействия с опухолевыми клетками уже существующих.

На сегодняшний день исследователями было предложено множество способов повышения селективности препаратов химиотерапии с использованием достижений в области нанобиотехнологии: квантовые точки, металлические наночастицы, фуллерены, нанотрубки, нанощетки и липосомы [3–8]. При этом одним из самых высокоточных и безопасных для пациентов способов введения лекарственных препаратов в онкологически трансформированные клетки являются иммунонацеливаемые стелс-липосомы [9-10], которые позволяют реализовать стратегию борьбы с патологией, не нанося вреда нормальным здоровым клеткам.

Однако для понимания процессов взаимодействия липосомальной формы лекарственного препарата с клетками-мишенями нами был выбран простой вариант липосом, которые нагружали одним из самых популярных препаратов для химиотерапии – цисплатином [11-12], а для усиления его цитостатического эффекта в их состав вводили препарат растительного происхождения – апигенин [13-20].

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве клеток-мишеней нами были использованы перитонеальные макрофаги самцов белых лабораторных мышей линии CD-1, массой 18–20 г и возрастом 2–2,5 месяца, которые содержались на стандартном пищевом рационе вивария. Работа проводилась в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации, Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях (Статья 27 от 22.09.2010 года), и рекомендациями «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Academy Press, USA, 2011).

Липосомы получали методом дегидратации/регидратации по следующей схеме. Раствор фосфатидилхолина (Sigma) (0,5%) и холестерина (Sigma) (0,5%) в этиловом спирте выпаривали на ротаторном испарителе IKA RV10 Control при температуре водяной бани 60 °C и остаточном давлении 170 мм.рт.ст., до образования на дне колбы тонкой пленки липидного моно слоя. Затем добавляли буферный раствор Хенкса с pH 7,4 в объеме, равном объему раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивали в течение минуты, осуществляя самосборку липосом. Полученную суспензию подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Qsonica Q500 (20 кГц, в импульсном режиме) в течение 15 минут для стандартизации размера в 200 нм. Нагрузку липосом препаратами цисплатина (0,5 мг/мл) в смеси с апигенином в концентрациях 5, 10, 20 и 50 мкмоль/л проводили на этапе введения раствора Хенкса. Степень включения модификаторов контролировали спектрофотометрически по их остаточной концентрации в надосадочной жидкости после осаждения липосом. Модификацию клеток липосомальным препаратом цисплатина с добавлением апигенина проводили в течение 1 часа.

Анализ жизнеспособности клеток и метаболической активности проводили методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе Guava EasyCyte 8HT (Merck Millipore, Франция) по стандартным

протоколам [21]. Оценку степени повреждения генома проводили с помощью метода ДНК-комет.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе исследования нами была проведена оценка жизнеспособности клеток после модификации липосомами, содержащими как отдельно цисплатин, так и в комбинации с различными концентрациями апигенина. Для этого мы воспользовались коммерческим набором красителей Guava ViaCount.

Анализ полученных результатов показал, что в контрольных образцах перитонеальных макрофагов мыши уровень жизнеспособности составил 93% (Рис 1а), а концентрация живых клеток не менее $2 \cdot 10^9$ /л (Рис. 1б).

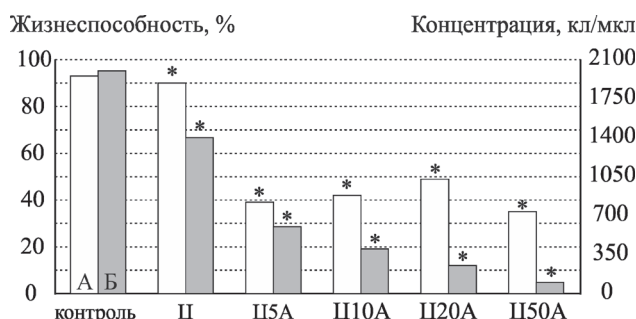


Рис. 1. Динамика изменения жизнеспособности (А) и концентрации живых перитонеальных макрофагов мыши (Б) в условиях воздействия комбинированной липосомальной формы цисплатина и апигенина. Обозначения: Ц — модификация клеток осуществлялась липосомами, содержащими только цисплатин, Ц5А, Ц10А, Ц20А, Ц50А — липосомы содержали цисплатин с добавлением апигенина в концентрациях от 5 до 50 мкмоль/л соответственно, * — отличия от контроля статистически достоверны.

Модификация клеток содержащими цисплатин липосомами и последующая инкубация в течение 1 часа приводила к тому, что количество клеток в суспензии падало с $2 \cdot 10^9$ /л до $1,4 \cdot 10^9$ /л, а их жизнеспособность снижалась до 90%. Введение же липосомального цисплатина с добавлением апигенина в концентрациях 5, 10, 20 и 50 мкмоль/л вызывает не только значительное снижение концентрации тестовых клеток с $6 \cdot 10^8$ /л до $1 \cdot 10^8$ /л, но и жизнеспособность тех, которые сохранили свою структурную целостность. При этом уровень зарегистрированного показателя варьировал в диапазоне 35,9 – 49%. Таким образом, введение в состав липосом апигенина во всем используемом диапазоне концентраций вызывает значительное снижение

жизнеспособности макрофагов (более чем в 2 раза). При этом он оказывает синергичный эффект действию цисплатина, снижая как количество тестовых клеток в системе, так и их жизнеспособность.

Для анализа метаболической активности и структурной целостности генома перитонеальных макрофагов мышей мы воспользовались способностью интеркалирующего флуоресцентного красителя - акридинового оранжевого взаимодействовать только с молекулами ДНК (зеленая флуоресценция) и РНК (красная флуоресценция), но не со свободными нуклеотидами. Результаты представлены на Рис. 2 и в Таблице 1.

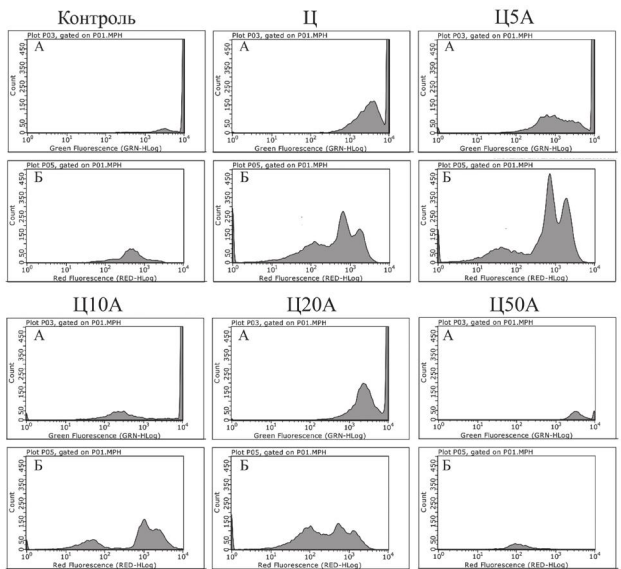


Рис. 2. Распределение клеток по уровню содержания ДНК - зеленая флуоресценция (А) и РНК - красная флуоресценция (Б) в условиях воздействия комбинированной липосомальной формы цисплатина и апигенина. Обозначения вариантов экспериментов аналогичны рис. 1

Анализ содержания нуклеиновых кислот в клетках показал, что при добавлении липосомальной формы цисплатина происходит снижение интенсивности зеленой флуоресценции маркерного

красителя на 24,15%, что свидетельствует о том, что действующее вещество высвобождается из липосом при их захвате клеткой, оказывая существенное генотоксическое действие.

Как было показано ранее, введение в липосомы в дополнение к цисплатину апигенина в концентрации 5 мкмоль/л приводит к снижению концентрации жизнеспособных клеток на 70%, при этом у сохранившихся жизнеспособность макрофагов не было выявлено статистически достоверного снижения интенсивности зеленой флуоресценции относительно контроля. Уровень красной флуоресценции этих клеток, зависящий от концентрации суммарной мРНК в клетке, был снижен относительно аналогичного показателя нативных иммунцитов в 3 раза. Это свидетельствует в пользу того, что клетки с минимальной скоростью биосинтетических процессов могут проявлять устойчивость к действию модификатора, так как изначальное соотношение нагруженных смесью апигенина и цисплатина липосом к клеткам составляло 100:1. Увеличение концентрации апигенина в липосомах в 2, 4 и 10 раз соответственно вызывало снижение интенсивности зеленой флуоресценции тестовых образцов клеток на 16,93; 31,92 и 61,57%. Изменение сигнала одноцепочечных нуклеиновых кислот относительно контрольных образцов варьировало в диапазоне от 17,43% до 66,36%.

Для подтверждения обнаруженного эффекта снижения количества ДНК в исследуемых клетках мы воспользовались методом ДНК-комет в тех же самых условиях модификации клеток (рис. 3 и таблица 2). Оценку повреждающего действия лекарственных препаратов проводили при помощи программы CometScore.

Анализ полученных результатов показал, что модификация тестовых клеток липосомами, нагруженными не только цисплатином, но и совместно с апигенином, приводит к уменьшению содержания ДНК в кометах, а так же в моменте хвоста кометы.

Таблица 1

Уровень метаболической активности перитонеальных макрофагов мыши в условиях комбинированного воздействия липосомальной формы цисплатина с добавлением апигенина

Вариант исследуемого образца	I _{фл} ДНК	I _{фл} РНК	Метаболическая активность
Контроль	5585 ± 80	327 ± 17	0,059
Цисплатин	4236 ± 29	203 ± 9	0,048*
Цисплатин + 5 мкМ апигенина	5440 ± 79	103 ± 8	0,019*
Цисплатин + 10 мкМ апигенина	4639 ± 86	270 ± 16	0,058
Цисплатин + 20 мкМ апигенина	3802 ± 68	258 ± 16	0,068*
Цисплатин + 50 мкМ апигенина	2178 ± 62	110 ± 3	0,051*

* Отличия от контроля статистически достоверны при уровне значимости P = 95%

Таблица 2

Параметры степени повреждения генома перитонеальных макрофагов мыши, полученные с помощью метода ДНК - комет

Образец	Содержание ДНК в комете (%)	Момент хвоста кометы
Контроль	35,74±1,56	2,36±0,12
Цисплатин	27,98±1,39	1,32±0,07
Цисплатин + 5 мкМ апигенина	23,98±1,20	1,07±0,05
Цисплатин + 10 мкМ апигенина	22,87±1,13	1,01±0,05
Цисплатин + 20 мкМ апигенина	21,39±1,06	0,86±0,04
Цисплатин + 50 мкМ апигенина	20,98±1,05	0,70±0,03

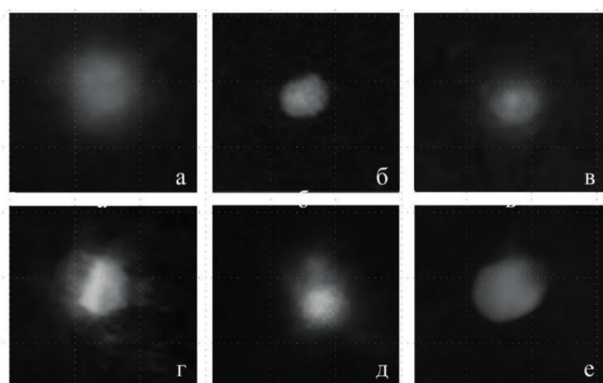


Рис. 3. Изображение ДНК-«комет» перитонеальных макрофагов лабораторных мышей. Обозначения: а - контроль, б - цисплатин, в - цисплатин + 5 мкмоль/л апигенина, г - цисплатин + 10 мкмоль/л апигенина, д - цисплатин + 20 мкмоль/л апигенина, е - цисплатин + 50 мкмоль/л апигенина

ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе проведения исследования мы показали, что липосомальная форма используемого в химиотерапии препарата цисплатин может взаимодействовать с клетками-мишенями, способствуя высвобождению действующего вещества непосредственно в них. Что делает проведение терапии онкологических патологий более прогнозируемым и эффективным.

Введение в состав липосом дополнительного действующего компонента – апигенина, позволило в значительной мере повысить эффективность цитостатического действия цисплатина за счет усиления продукции в клетках активных кислородных метаболитов и, возможно, ряда эндонуклеаз, с ростом активности которых может быть связано усиление деградации геномной ДНК в клетках. Обнаруженные нами эффекты позволят пересмотреть стратегию борьбы с онкологическими патологиями, сделав ее более эффективной и менее опасной для пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Nurgali K. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? / K. Nurgali, R. T. Jagoe, R. Abalo // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Т. 9. – С. 245.
2. Evaluation of current practice: management of chemotherapy-related toxicities / S. Lheureux, B. Clarisse, V. Launay-Vacher [et al.] // *Anti-Cancer Drugs*. – 2011. – Vol. 22. – № 9. – P. 919-925.
3. Наквасина М.А. Бионанотехнологии: достижения, проблемы, перспективы развития: учеб. пособие / М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов // Воронежский государственный университет. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2015. – С. 47-58. // Nakvasina M.A. Bionanotekhnologii: dostizheniya, problemy, perspektivy razvitiya: ucheb. posobie / M.A. Nakvasina, V.G. Artyukhov // *Voronezhskij gosudarstvennyj universitet*. – Voronezh: Izdatel'skij dom VGU, 2015. – S. 47-58.
4. Барышников, А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов / А. Ю. Барышников // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2012. – Т. 67, № 3. – С. 23-31. // Baryshnikov, A. Yu. Nanostrukturirovannye liposomal'nye sistemy kak sredstvo dostavki protivopukholevykh preparatov / A. Yu. Baryshnikov // *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk*. – 2012. – Т. 67, № 3. – S. 23-31.
5. Алексанян К. Г. Средства адресной доставки лекарственных препаратов / К. Г. Алексанян, О. В. Коткова, Ю. С. Чесовских // *Week of Russian science (WeRuS-2024) : Сборник материалов XIII Всероссийской недели науки с международным участием, посвященной Национальному дню донора, Саратов, 16–19 апреля 2024 года*. – Саратов: Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского – 2024. – С. 390-392. // Aleksanyan K. G. Sredstva adresnoj dostavki

- lekarstvennykh preparatov / K. G. Aleksanyan, O. V. Kotkova, Yu. S. Chesovskikh // Week of Russian science (WeRuS-2024) : Sbornik materialov KhIII Vserossijskoj nedeli nauki s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoj Natsional'nomu dnyu donora, Saratov, 16–19 aprelya 2024 goda. – Saratov: Saratovskij gosudarstvennyj meditsinskij universitet imeni V.I. Razumovskogo – 2024. – S. 390-392.
6. Allen T.M. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications / T. M. Allen, P. R. Cullis // Advanced drug delivery reviews – 2013. – Vol. 65(1) – P 36-48.
7. Carbon Nanomaterials for Drug Delivery and Cancer Therapy / M. Chakrabarti, R. Kiseleva, A. Vertegel, S. K. Ray // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2015. – Vol. 15. – № 8. – P. 5501-5511.
8. Carbon Nanotubes as Emerging Nanocarriers in Drug Delivery: An Overview / A. Suttee, V. Mishra, M. Singh [и др.] // International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance. – 2020. – Т. 11. – № 03. – С. 373-378.
9. Gao Y., Shelling A. N., Nolan E., Porter D., Leung E., Wu, Z. Liposome-enabled bufalin and doxorubicin combination therapy for trastuzumab-resistant breast cancer with a focus on cancer stem cells. / Y. Gao, A. N. Shelling, E. Nolan, D. Porter, E. Leung, Z. Wu // Journal of liposome research. – 2024. – Vol 34(3). – P 489–506.
10. Applications of liposomes and lipid nanoparticles in cancer therapy: current advances and prospects / Z. Cheng, H. Huang, M. Yin, H. Liu // Experimental Hematology & Oncology. – 2025. – Т. 14. – № 1. – С. 11.
11. Кулинчик Т.В. Цисплатин: история открытия противоопухолевой активности / Т. В. Кулинчик // Медицинские технологии. Оценка и выбор. – 2013. – № 1(11). – С. 87-90. // Kulinchik T.V. Tsisplatin: istoriya otkrytiya protivopukholevoj aktivnosti / T. V. Kulinchik // Meditsinskie tekhnologii. Otsenka i vybor. – 2013. – № 1(11). – С. 87-90.
12. Romani A. M. P. Cisplatin in cancer treatment. Biochem Pharmacol. / A. M. P. Romani. – 2022. – Vol. 206. – P 115323.
13. Обзор биологической активности флавоноида апигенина: противовоспалительная, противоопухолевая, нейропротекторная и противовирусная / А. Э. Биджиева, И. О. Шальнев, А. С. Чиряпкин [и др.] // Бюллетень науки и практики. – 2023. – Т. 9, № 10. – С. 117-131. // Obzor biologicheskoy aktivnosti flavonoida apigenina: protivovospalitel'naya, protivopukholevaya, nejroprotektornaya i protivovirusnaya / A. E. Bidzhieva, I. O. Shal'nev, A. S. Chiryapkin [i dr.] // Byulleten' nauki i praktiki. – 2023. – Т. 9, № 10. – С. 117-131.
14. Xu L. et al. The anticancer potential of apigenin via immunoregulation /L. Xu, et al //Current pharmaceutical design. – 2021. – Vol. 27. – №. 4. – P. 479-489.
15. Shukla S., Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. / S. Shukla, S. Gupta // Pharm. Res. – 2010. – Vol. 27. – P. 962-978.
16. Apigenin, a natural flavonoid, promotes autophagy and ferroptosis in human endometrial carcinoma Ishikawa cells in vitro and in vivo. /Y. Liang, Q. Zhong, R. Ma, et al.// Food Science and Human Wellness. – 2023. – Vol 12(6). – P 2242-2251.
17. Мартынов В. А. Об изменениях структуры и биохимических параметров в клетках под влиянием раковой трансформации и их восстановлении под влиянием средств, не обладающих противоопухолевой активностью /В.А. Мартынов // Вестник российских университетов. Математика. – 2003. – №2. – С. 315-322. // Martynov V. A. Ob izmeneniyakh struktury i biokhimicheskikh parametrov v kletkakh pod vliyaniem rakovoj transformatsii i ikh vosstanovlenii pod vliyaniem sredstv, ne obladayushchikh protivopukholevoj aktivnost'yu /V.A. Martynov // Vestnik rossijskikh universitetov. Matematika. – 2003. – №2. – С. 315-322.
18. Reactive oxygen species: Key players in the anticancer effects of apigenin? / O. R. Oyenih, A. B. Oyenih, T. D. Alabi [et al.] // Journal of Food Biochemistry. – 2022. – Vol. 46. № 2. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.14060> (date accessed: 19.05.2025).
19. Разработка липосомальных форм лекарственных препаратов: методы оценки и показатели качества / Е. В. Мельникова, Д. В. Горячев, и др. // Вестник РГМУ. – 2018. – №6. С. 35-42// Razrabotka liposomal'nykh form lekarstvennykh preparatov: metody otsenki i pokazateli kachestva / E. V. Mel'nikova, D. V. Goryachev, i dr. // Vestnik RGMU. – 2018. – №6. С. 35-42
20. Metformin-induced ROS upregulation as amplified by apigenin causes profound anticancer activity while sparing normal cells / M. S. Warkad, C.-H. Kim, B.-G. Kang [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 14002.
21. Flow Cytometry Protocols : Methods in Molecular Biology. Vol. 2779 / T. S. Hawley, R. G. Hawley eds. . – New York: Springer US, 2024. – 458p.

Воронежский государственный университет

Voronezh State University

Борщевская Маргарита Александровна, магистрант кафедры биофизики и биотехнологии

Borshchevskaya Margarita A., Master's student, Department of Biophysics and Biotechnology

Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, Заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии

Artyukhov Valery G., PhD., DSci, Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Колтаков Игорь Александрович, кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии

Koltakov Igor A., PhD., Associate Professor, Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

ON THE ENHANCEMENT OF CYTOSTATIC EFFECT OF LIPOSOMAL CISPLATIN BY APIGENIN

M.A. Borshchevskaya, V.G. Artyukhov, I.A. Koltakov

Voronezh State University

Abstract. One of the main problems of modern cancer chemotherapy is the lack of selectivity of chemotherapy drugs, which leads to severe side effects in patients. A promising approach to improving the effectiveness and safety of cancer treatment is the development of targeted drug delivery systems. In this study, we evaluated the cytotoxic and genotoxicity of a liposome-based formulation of cisplatin combined with the flavonoid apigenin using peritoneal macrophage cells from CD-1 mice as a model system.

We prepared liposomes loaded with 0.5 mg of cisplatin and different concentrations of apigenin (5, 10, 20 and 50 μM) using the dehydration-rehydration technique. Cells were exposed to the liposomal formulations for 1 h. We used flow cytometry to assess cell viability and metabolic activity, as well as the DNA comet assay to measure DNA damage.

Our results showed that the combination of liposomes and cisplatin had a more potent cytotoxic effect than liposomes alone. The addition of apigenin at all concentrations tested resulted in a synergistic increase in cytotoxicity, with a decrease in cell viability to $1 \times 10^8/\text{L}$ compared to $1.4 \times 10^9/\text{L}$ with cisplatin alone, and a reduction in viability by more than twofold (35.9-49%). Furthermore, the DNA comets assay revealed a dose-related increase in DNA damage, with a significant decrease in the head and tail moments of the comets as the apigenin concentration increased. These findings suggest that the encapsulation of chemotherapeutic agents in liposomes can enhance their cytostatic effects and damage to tumor cells' genomes. Our findings support the potential of further research into these combined liposome systems for developing more effective and targeted cancer therapies.

Keywords: cisplatin, apigenin, targeted delivery of lekart, antitumor therapy