

УДК 576.5

doi:10.18720/SPBPU/2/id23-444

Хо Минь Ньыт<sup>1,2</sup>,

магистрант Института биомедицинских систем и биотехнологий,

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия,

<sup>2</sup>Индустриальный университет Хошимина,

Хошимин, Вьетнам

hominhnhut@moet.edu.vn

Фунг Тхи Ким Хуэ<sup>3,4</sup>, доктор биологических наук,

профессор Института морской биохимии,

<sup>3</sup>Вьетнамская академия наук и технологий,

Ханой, Вьетнам,

<sup>4</sup>Институт медицинских исследований и развития образования

в Центральном нагорье,

Гиа Лай, Вьетнам

dmhue.c3chuyen.tnn@moet.edu.vn

## **ИНГИБИРОВАНИЕ И НАЦЕЛИВАНИЕ НА РАКОВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОМПЛЕКСОМ НАНОЛИПОСОМА – АНТИТЕЛО (АМС)**

**Аннотация.** Целенаправленное лечение опухолевых сосудов является сложным аспектом в современной терапии рака. В данном исследовании авторы использовали нанOLIпосомы как систему доставки противоопухолевых препаратов. Для образования наносуспензии авторы извлекали анакардиевую кислоту (АА) из оболочек орехов кешью. НанOLIпосомы имеют маленький размер, что облегчает их усвояемость, а также снижает токсичность, увеличивает их биодоступность и уменьшает требуемую дозу. Авторы использовали моноклональные антитела (mAbs) для усиления противоопухолевого эффекта АА. mAbs специфически связываются с маркерами раковых стволовых клеток (CSCs), образуя целевой комплекс, который ингибирует CSCs. Этот комплекс, названный нанOLIпосомой, является моноклональным антителом (АМС), которое изучается с помощью устройства DLS, что позволяет оценить его размер

как примерно 99,08 нм, PDI 0,228 и нейтральный зет-потенциал -9,38 мВ. При сочетании с моноклональным антителом mAb<sup>^</sup>CD133 полученный АМС проявляет увеличенную способность ингибировать раковые стволовые клетки NTERA-2, с IC<sub>50</sub> = 299,79 ± 13,39 мкМ по сравнению с AA-DMSO. Кроме того, АМС имеет очень низкую скорость ингибирования здоровых клеток (8,04%), в то время как образец AA-DMSO ингибирует здоровые клетки до 48,27%, несмотря на высокие уровни ингибирования NTERA-2. Эти результаты демонстрируют превосходство целенаправленного ингибирующего эффекта АМС над другими образцами.

**Ключевые слова:** нанOLIпосомы, раковые стволовые клетки, доставка лекарств, таргетинг, лечение рака.

Ho Minh Nhut<sup>1,2</sup>,  
master's student in biotechnology,  
<sup>1</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,  
St. Petersburg, Russia,  
<sup>2</sup>Industrial University of Ho Chi Minh City,  
Ho Chi Minh City, Vietnam  
hominhnhut@moet.edu.vn

Phung Thi Kim Hue<sup>3,4</sup>, DCs in biology,  
Professor of Institute of Marine Biochemistry,  
<sup>3</sup>Vietnam Academy of Science and Technology,  
Hanoi, Vietnam,  
<sup>4</sup>Institute for Medical Research and Education Development  
in the Central Highlands,  
Gia Lai, Vietnam  
dmhue.c3chuyen.tnn@moet.edu.vn

## INHIBITION AND TARGETING TO CANCER STEM CELLS BY THE NANOLIPOSOME – ANTIBODY COMPLEX (AMC)

**Abstract.** Targeting tumor blood vessels is a critical aspect of current cancer therapies. This study employed nanoliposomes as a delivery system for anticancer drugs, specifically focusing on Anacardic Acid (AA) isolated from cashew nut shells, which is combined with a nanoemulsion complex to form nanosuspensions. Nanoliposomes have small sizes, making them eas-

ily absorbed and reducing toxicity, while increasing their bioavailability and decreasing the required dosage. Monoclonal antibodies (mAbs) were also utilized to enhance the antitumor effect of AA. The mAbs bind specifically to cancer stem cell markers (CSCs), forming a target complex that inhibits CSCs. This complex, named the nanoanacardial complex – monoclonal antibody (AMC), was characterized using a DLS device and showed a size of about 99,08 nm, a PDI of 0,228, and a neutral zeta potential of -9,38 mV. When combined with the monoclonal antibody mAb<sup>^</sup>CD133, the resulting AMC demonstrated increased ability to inhibit NTERA-2 cancer stem cells, with  $IC_{50} = 299,79 \pm 13,39 \mu\text{M}$ , compared to AA-DMSO, which showed a significant difference through millet ( $p < 0,05$ ). Additionally, the AMS had a very low rate of inhibition of healthy cells (8,04%), while the AA-DMSO sample inhibited healthy cells up to 48,27%, despite inhibiting high levels of NTERA-2. These results demonstrate that the inhibitory effect of AMC on the target direction is superior to that of other samples.

**Key words:** nano liposomes, cancer stem cells, drug delivery, targeting, cancer treatment.

Несмотря на усилия исследователей, рак по-прежнему остается серьезным заболеванием, угрожающим жизни человека и являющимся значительной проблемой для общества. Согласно статистике Международного агентства по изучению рака за 2020 год было зарегистрировано 19,3 миллиона новых случаев рака, в том числе 9,96 миллиона летальных исходов. По сравнению с 2018 годом, число новых случаев выросло на 2 миллиона, а количество смертей – на 0,36 миллиона (IACR-WHO, 2020). Следовательно, нацеливание на сосуды опухоли имеет важное значение для лечения рака. В связи с этим инкапсуляция противоопухолевых препаратов в липосомальную систему обеспечивает безопасную платформу для адресной доставки противоопухолевых препаратов при лечении рака. Это может быть полезно для снижения цитотоксического воздействия противоопухолевых препаратов на нормальные клетки. То же самое можно сказать и об анакардиевой кислоте (AA), естественном активном ингредиенте, составляющем примерно 65% экстракта коры кешью (*Anacardium occidentale L.*), который является основной культурой Центрального нагорья Вьетнама.

Нанотехнологии, применяемые для создания материалов малых размеров, являются одним из способов решения проблемы недостаточной усвояемости биологически активных веществ, таких как анакардиевая кислота. В последние десятилетия нанолипосомы были использованы в качестве системы доставки противоопухолевых препаратов [1] и имеют множество преимуществ перед другими системами доставки лекарств. Следовательно, для повышения биодоступности анакардиевой кислоты нанотехнологии являются эффективным и жизнеспособным решением.

Полученную анакардиновую кислоту использовали для получения нанолипосом, в которые включали анакардиновую кислоту по модифицированному методу Бэнгхема и Луана. Для этого липиды, включая фосфатидилхолин (PS), холестерин и DSPE-PEG2000-малеимид, были растворены в растворителе дихлорметане, после чего анакардиновую кислоту смешали со смесью липидов в соответствии с определенными молярными соотношениями PS: холестерин: DSPE-PEG-Mal: разные анакардиновые кислоты. Затем провели вакуумное выпаривание растворителя для создания тонкого липидного слоя. Полученную тонкую пленку липидов, содержащую анакардиновую кислоту, полностью гидратировали буфером PBS в течение 10 минут, к которому добавили mAb<sup>CD133</sup> в подходящей концентрации. Раствор обработали ультразвуком при 2 атмосферах с 20-секундным циклом обработки и 10-секундным отдыхом, повторяя этот процесс 10 раз. Затем раствор центрифугировали при скорости 12 000 оборотов в минуту в течение 90 минут для сбора остатков липосом. Супернатант был собран для определения эффективности сборки. Для получения наноразмерных липосом из липосом с разными размерами необходимо было удалить крупные частицы липосом путем трехкратного прессования суспензии через 13-мм ПВДФ-мембрану размером 0,1 мкм. Для измерения несвязанных антикорпускул (АК) и неконъюгированных моноклональных антител (mAb<sup>CD133</sup>) был собран супернатант.

Используя сканирующий электронный микроскоп с полевой эмиссией (FESEM) (система HITACHI S-4800 FESEM), была произведена морфологическая характеристика полученных наночастиц. Размер липосом был определен методом динамического светорассеяния после разведения до концентрации липидов приблизительно 10 мкМ в 150 мМ NaCl. Средний диаметр (объемный вес), индекс дисперсии (PDI) и дзета-потенциал липосом были измерены при помощи Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Концентрации фосфолипидов были измерены анализом феррототиоцианата аммония на спектрометре Shimadzu UV 2401 PC (Shimadzu, Киото, Япония), а концентрация mAb<sup>CD133</sup> была измерена при  $\lambda = 667$  нм на том же спектрофотометре после растворения липосомы в метаноле.

**Метод культивирования клеточных линий *in vitro*.** Для культивирования клеточных линий *in vitro* была использована процедура банка клеток ATCC (Американская коллекция типовых культур, США). Раковые стволовые клетки (линия NTERA-2, кавказская плюрипотентная эмбриональная карцинома человека – стволовые раковые клетки) человеческого эмбриона и человеческие непрерывные клетки клона (CCD-18Co) были культивированы в среде DMEM, содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES и 1,0 мМ пирувата натрия, 10% эмбриональной сыворотки коровы (FBS). Клетки были пересеяны через 3–5 дней в соотношении (1:3) и инкубированы в термостате при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

**Тест МТТ для оценки токсичности раковых стволовых клеток.** При использовании соли тетразолия в качестве реагента в колориметрии происходит прочное прилипание кольца тетразолия реагента к митохондриям активных клеток. Под воздействием фермента дегидрогеназы в клетках происходит изменение желтого цвета МТТ на формазановый фиолетовый цвет. Для эксперимента клетки собирали, помещали в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали в инкубаторе с CO<sub>2</sub>-содержащей атмосферой при температуре 37 °С. Затем в лунки культурального планшета добавляли по 20 мкл МТТ (5 мг/мл) и продолжали инкубацию в течение 4 часов при 37 °С. После этого удаляли среду и МТТ

излунок и добавляли 100 мкл DMSO для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Оптическая плотность (OD) раствора в лунках измерялась при 540 нм с помощью измерителя ELISA. Количество жизнеспособных клеток будем рассчитывать по формуле:

$$\% \text{ выживать} = 100 \times \frac{\text{OD (реагент)} - \text{OD (холостой контроль)}}{\text{OD (DMSO)} - \text{OD (пустой контроль)}}$$

**Метод анализа клеточного цикла.** Для проведения анализа клеточного цикла клетки были обработаны образцом, после чего были собраны путем трипсинизации, промыты холодным 1X PBS и фиксированы 70% этанолом при температуре 4 °С в течение 2 часов. Фиксированные клетки были подвергнуты двукратному промыванию холодным PBS 1X, после чего были инкубированы с использованием РНКазы А (1 мг/мл) на водяной бане при температуре 37 °С в течение 15 минут. Затем было произведено окрашивание клеток йодидом пропидия (1 мг/мл) в течение 1 часа. Контроль клеточного цикла определяли путем анализа 10 000 клеток на образец с использованием системы проточного цитометра Novocyte и программного обеспечения NovoExpress (ACEA Bioscience Inc.).

**Аналитический метод апоптоза.** Используя проточную цитометрию, был измерен процесс гибели и некроза клеток после обработки образца. Для этого были культивированы клетки (500 000 клеток/лунку) на 6-луночных планшетах. За 30 минут до окончания инкубации к клеткам добавляли перекись водорода (10% по объему) для создания положительного контроля апоптоза. Для предотвращения агрессивного некроза клеткам добавляли 8 мкл Triton X-100 (0,1% по объему) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. После инкубации клетки были собраны путем трипсинизации и центрифугирования (2000 об/мин, 5 мин, комнатная температура) и обработаны в соответствии с процедурой производителя. Далее результаты были анализированы с использованием программ-

ного обеспечения CellQuest™ Pro (BD). Результаты обработанного образцом клеток были сравнены с результатами необработанных контрольных клеток.

Каждый тест исследования был проведен не менее чем в трех повторениях.

**Результаты характеристики, свойства и морфология АМС.** При определении размера и потенциала АМС прибором динамического светорассеяния DLS результаты, представленные в таблице 1 и на рисунке 1, показывают, что АМС имеет размер около 99,08 нм, индекс PDI достигает 0,228; Дзета-потенциал нейтральный (-9,38 мВ). Этот результат согласуется с исследованием Naeri, подходящие нанولیпосомы имеют размер (101 ± 12 нм) и дзета-потенциал (-9 ± 2 мВ), PDI (0,25 ± 1) [2]. Отсюда видно,

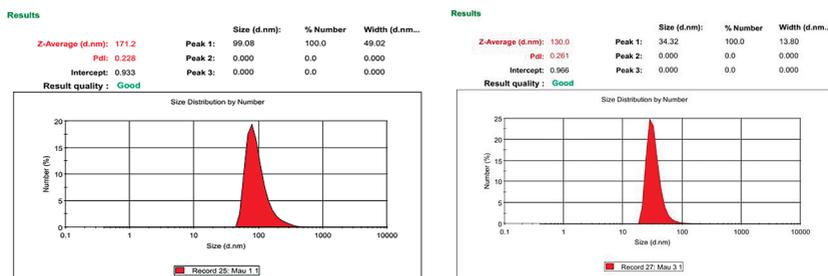


Рис. 1. Распределение и размер выборки исследования

Таблица 1

**Распределение и размер исследованных образцов, связанные со способностью создавать липосомы**

Липосомы комплекс	Z-Average (д.мм)	PDI	Zeta (мВ)
АМС	170,0 ± 21,1	0,23 ± 0,01	-9,38 ± 0,52
Липосомы	130,0 ± 9,57	0,26 ± 0,04	-12,3 ± 1,18

что АМС обладает всеми свойствами биомедицинского нанобиологического применения. Как видно из рисунка 3, полученный

АМС имеет сферическую форму, достаточно однородную, размером около 100-170 нм, что соответствует данным, измеренным системой Zetasizer Nano-Z.

**Способность АМС ингибировать раковые стволовые клетки *in vitro*.** Как показано, кристаллическая ацетилсалициловая кислота (АК) ингибирует клетки NTERA-2 с низкой активностью, что подтверждается значениями  $IC_{50}$  равными  $466,39 \pm 5,18$  мкм. С использованием АА-DMSO наблюдается более эффективное ингибирование клеток NTERA-2, по сравнению с диацетатом ( $IC_{50} = 386,19 \pm 7,11$  мкм) (рис. 3). Это говорит о том, что АА по себе не специфична для клеток-стволковых клеточных опухолей (CSC) и имеет низкую биодоступность, как указывает Филипчак [3]. В дальнейшем, для повышения биодоступности и улучшения специфичности АА была произведена инкапсуляция липосомами

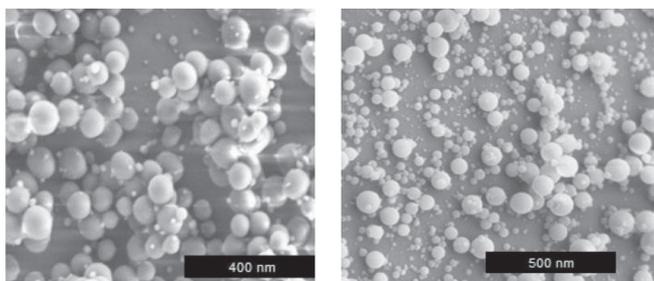


Рис. 2. Изображения SEM при разных размерах АМС

и связывание с моноклональным антителом (mAb<sup>CD133</sup>). Сгенерированный комплекс ацетилсалициловой кислоты с липосомами и моноклональным антителом (АМС) обладал более сильным ингибирующим действием на клетки NTERA-2 с  $IC_{50}$  равным  $299,79 \pm 13,39$  мкм, по сравнению с использованием только липосомами с АА ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что АМС ингибировал здоровые клетки с небольшой скоростью (8,04%), в то время как образец АА-DMSO, хотя и ингибировал клетки NTERA-2 на высоком уровне, также убивал здоровые клетки до 48,27%.

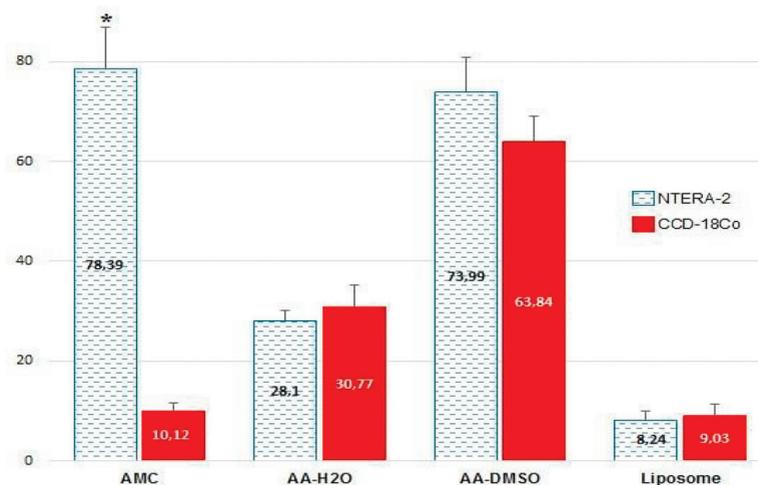


Рис. 3. Способность ингибировать рост типов клеток (NTERA-2 и CCD-18Co) под воздействием проб

Эти результаты показывают, что AMC обладает лучшими ингибирующими свойствами на целевые клетки, чем другие образцы. Таким образом, ингибирование клеток NTERA-2 с использованием AMC в данном исследовании может быть обусловлено повышением биодоступности и специфичности AA с помощью инкапсуляции липосомами и связывания с моноклональным антителом mAb<sup>CD133</sup>.

**Способность AMC к остановке клеточного цикла.** Как было отмечено выше, AMC обладает способностью ингибировать NTERA-2. Для лучшего понимания механизма ингибирования был проведен проект, в рамках которого изучался контроль клеточного цикла AMC. Результаты эксперимента, представленные на рисунке 4, показывают, что при концентрации AMC в 20 мкм происходит блокировка фазы G1/S (51,82%) клеток NTERA-2. В то же время, нанолипосомы AA захватывают фазу G1/S (33,65%), и эффект анакадовой кислоты требует дополнительного исследования для уточнения его механизма.

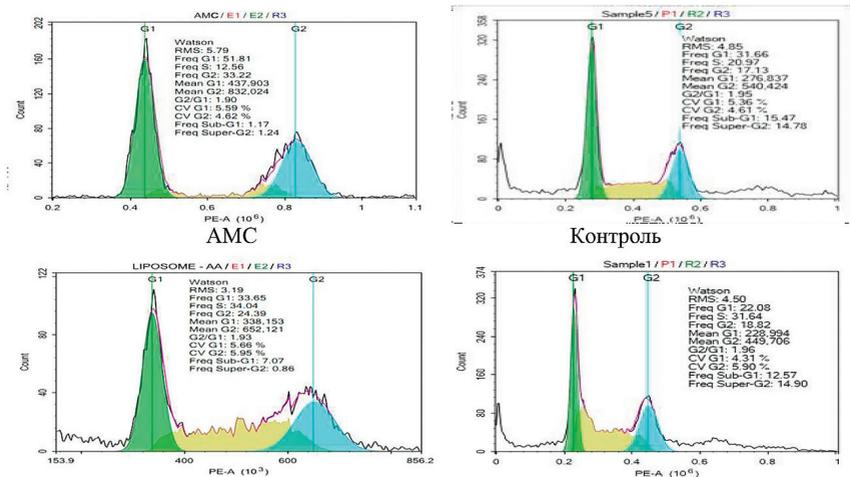


Рис. 4. Результаты контроля клеточного цикла NTERA-2 под действием AMC и липосомы – AA

**Способность AMC индуцировать апоптоз раковых стволовых клеток.** На рис. 5 продемонстрировано, что AMC вызывает 58,94% апоптоза в линии клеток NTERA-2, в то время как отрицательный контроль показал лишь 3,07% апоптоза и наблюдалась ядерная конденсация или фрагментация. Результаты проточной цитометрии на рисунке 6 показали, что при концентрации AMC 0,01 мкг/мл процент клеток NTERA-2 в ранней стадии апоптоза составил 9,45%, в поздней стадии – 6,17%, а процент некротических клеток составил 9,45%. При концентрации AMC 0,02 мкг/мл количество клеток NTERA-2 в ранней стадии апоптоза значительно возросло до 72,10%, в поздней стадии апоптоза – 11,75%, а количество некротических клеток увеличилось до 4,12% по сравнению с отрицательным контролем, при этом процент увеличения составил 22,91%. Исследование показало, что AMC стимулирует апоптоз раковых стволовых клеток, которые обычно являются бессмертными [4], и превращает их в нормальные клетки. Исследования Clevers и его коллег свидетельствуют о том, что раковые стволовые клетки связаны



стволовые клетки, что повышает биодоступность анакадовой кислоты и открывает большие возможности для использования данного источника, полученного из растительных остатков во Вьетнаме.

## REFERENCES

1. **Lee W. H., Loo C. Y., Traini, D., Young P. M.** Nano-and micro-based inhaled drug delivery systems for targeting alveolar macrophages. *Expert opinion on drug delivery*, 2015. № 12(6), P. 1009–1026. DOI: 10.1517/17425247.2015.1039509
2. **Haeri A., Behdokht A., Marjan D., Simin D.** Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 2014, № 13(Suppl). P. 3–14. PMID: 24711824
3. **Filipczak N., Jaromin A., Piwoni A., Mahmud M., Can Sarisozen, Torchilin V., and Gubernator J.** A triple co-delivery liposomal carrier that enhances apoptosis via an intrinsic pathway in melanoma cells. *Cancers*, 2019. № 11(12). 1982. DOI: 10.3390/cancers11121982
4. **Vinogradov S., Wei X.** Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. № 7(4). P. 597–615.
5. **Weihua Di, Marc-Georg Willinger, Rute A. S. Ferreira, Xinguang Ren, Shaozhe Lu, and Nicola Pinna.** Citric Acid-Assisted Hydrothermal Synthesis of Luminescent TbPO<sub>4</sub>:Eu Nanocrystals: Controlled Morphology and Tunable Emission. *J. Phys. Chem.* 2008. № 112. P. 18815–18820. DOI: 10.2217/nm.12.22
6. **Clevers H.** The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*, 2011. №17 (3). P. 313–319.