

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-83-87>

Оценка цитотоксического потенциала липосомального гемцитабина

Г.А. Оборотов^{1,2}, А.А. Рудакова¹, М.А. Барышникова¹, М.В. Дмитриева¹, И.И. Краснюк²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Григорий Александрович Оборотов oborot-off@yandex.ru

Введение. Гемцитабин применяется в онкологической практике для лечения ряда солидных опухолей, в том числе рака легкого. Данный препарат обладает высокой терапевтической эффективностью, ингибируя синтез ДНК и вызывая апоптоз опухолевых клеток. Однако гемцитабин имеет и недостатки, к которым относятся короткий период его полувыведения и быстрое метаболическое разрушение, что приводит к необходимости его частого введения в высоких дозах, в результате чего возрастает риск развития побочных эффектов. Для снижения токсичности и повышения терапевтической эффективности нами разработана липосомальная лекарственная форма гемцитабина.

Цель исследования – сравнительная оценка цитотоксической активности липосомального гемцитабина и раствора гемцитабина на клеточной линии рака легкого A549.

Материалы и методы. Цитотоксичность липосомального гемцитабина и раствора гемцитабина исследовали на клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549. Клетки культивировали в присутствии липосомального гемцитабина и раствора гемцитабина *in vitro* в течение 72 ч, а затем оценивали цитотоксичность препаратов с помощью МТТ-теста.

Результаты. Показано, что липосомальный гемцитабин обладал более высокой цитотоксичностью по сравнению со свободным гемцитабином. Концентрация полумаксимального ингибирования липосомального гемцитабина составила 0,47 мкМ, а свободного гемцитабина – 9,6 мкМ.

Заключение. Липосомальная форма гемцитабина обладает значительно более высокой цитотоксической активностью по сравнению с раствором свободного гемцитабина в отношении клеточной линии рака легкого A549. Включение гемцитабина в липосомы позволило улучшить проникновение лекарственного средства в опухолевые клетки, а также защитить его от преждевременной деградации.

Ключевые слова: гемцитабин, липосома, цитотоксическая активность, рак легкого

Для цитирования: Оборотов Г.А., Рудакова А.А., Барышникова М.А. и др. Оценка цитотоксического потенциала липосомального гемцитабина. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):83–7.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-83-87>

Evaluation of the cytotoxic potential of liposomal gemcitabine

Grigory A. Oborotov^{1,2}, Anna A. Rudakova¹, Maria A. Baryshnikova¹, Maria V. Dmitrieva¹, Ivan I. Krasnyuk²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 8, 2 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia

Contacts: Grigory Alexandrovich Oborotov oborot-off@ya.ru

Background. Gemcitabine is used in oncology for the treatment of various solid tumors, including lung cancer. Gemcitabine exhibits high therapeutic efficacy by inhibiting DNA synthesis and inducing apoptosis in tumor cells. However, the drug has drawbacks, such as a short half-life and rapid metabolic degradation, necessitating frequent administration of high doses, which increases the risk of side effects. To reduce toxicity and enhance therapeutic efficacy, we developed a liposomal formulation of gemcitabine.

Aim. To compare the cytotoxic activity of liposomal gemcitabine and gemcitabine solution on the A549 lung cancer cell line.

Materials and methods. The cytotoxicity of liposomal gemcitabine and gemcitabine solution was evaluated on the human lung adenocarcinoma cell line A549. Cells were cultured in the presence of liposomal gemcitabine and gemcitabine solution *in vitro* for 72 hours, and the cytotoxicity of the drugs was assessed using the MTT assay.

Results. Liposomal gemcitabine demonstrated higher cytotoxicity compared to free gemcitabine. Half maximal inhibitory concentration value for liposomal gemcitabine was 0.47 μM , while that for free gemcitabine was 9.6 μM .

Conclusion. The liposomal form of gemcitabine exhibits significantly higher cytotoxic activity compared to the free gemcitabine solution against the A549 lung cancer cell line. Incorporation of gemcitabine into liposomes improved drug penetration into tumor cells and protected it from premature degradation.

Keywords: gemcitabine, liposome, cytotoxic activity, lung cancer

For citation: Oborotov G.A., Rudakova A.A., Baryshnikova M.A. et al. Evaluation of the cytotoxic potential of liposomal gemcitabine. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):83–7. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-83-87>

Введение

Одним из широко применяемых в онкологической практике противоопухолевых средств является гемцитабин — антиметаболит пиримидина, который используется для лечения различных солидных опухолей [1, 2]. Эффективность гемцитабина варьирует в зависимости от типа опухоли. Например, при раке поджелудочной железы, одном из наиболее агрессивных онкологических заболеваний, гемцитабин является препаратом 1-й линии терапии, обеспечивая стабилизацию процесса у части пациентов, хотя полная ремиссия заболевания достигается нечасто [3]. При раке мочевого пузыря гемцитабин эффективен как в монотерапии, так и в комбинации с другими препаратами, особенно в случаях рецидивирующего заболевания после неудачного применения *Bacillus Calmette–Guérin* [4]. В лечении рака яичников гемцитабин используется в качестве препарата 2-й линии терапии, демонстрируя умеренную активность при рецидивирующих формах [5]. При холангиокарциноме гемцитабин в сочетании с оксалиплатином или цисплатином показал улучшение общей выживаемости по сравнению с монотерапией [6].

Гемцитабин демонстрирует высокую терапевтическую активность благодаря способности ингибировать синтез ДНК и вызывать апоптоз опухолевых клеток, однако его клиническое применение ограничено рядом факторов, включая короткий период его полувыведения и быстрое метаболическое разрушение [7–9]. Эти недостатки приводят к необходимости частого введения препарата в высоких дозах, что повышает риск развития побочных эффектов, таких как миелосупрессия, гепатотоксичность и легочные осложнения [10, 11]. Для преодоления указанных ограничений разрабатывают инновационные подходы к таргетной доставке гемцитабина, среди которых особое место занимает использование наноносителей, в частности липосомальных систем. Липосомы, представляющие собой фосфолипидные везикулы, обеспечивают защиту активного вещества от прежде-

временной деградации, увеличивают его биодоступность и позволяют осуществлять целенаправленную доставку в опухолевые ткани за счет эффекта усиленной проницаемости и удержания [12–14]. Липосомальные формы гемцитабина, находящиеся на стадиях доклинических и клинических испытаний, продемонстрировали способность продлевать циркуляцию препарата в кровотоке и улучшать его накопление в опухоли, что приводит к повышению терапевтической эффективности при снижении токсичности [15, 16].

Ранее нами проведены исследования, направленные на изучение влияния липидной композиции на эффективность пассивной загрузки гемцитабина в липосомы. Установлено, что использование насыщенных фосфолипидов с высокой температурой фазового перехода, таких как DPPC (дипальмитоилфосфатидилхолин) и DSPC (дистероилфосфатидилхолин), позволяет достигнуть высокой эффективности инкапсуляции (до 85 %) и загрузочной способности (до 4,8 % массовой доли примесей). На основе этих данных нами была разработана липосомальная лекарственная форма гемцитабина.

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка цитотоксической активности липосомального гемцитабина и раствора гемцитабина на клеточной линии рака легкого (РЛ) A549.

Материалы и методы

Липосомальный гемцитабин готовили методом гидратации тонкой липидной пленки, который является стандартным подходом для получения липосом с пассивной загрузкой гидрофильных препаратов, таких как гемцитабин. Итоговый состав липосом содержал следующую липидную композицию: гидрогенизированный яичный фосфатидилхолин (Е РС-3), холестерин и N-(карбонил-метоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, натриевая соль (MPEG-2000-DSPE) в молярном соотношении 1:0,7:0,089, которая была

выбрана на основе предварительных исследований, показавших максимальную эффективность инкапсуляции для этой композиции. Раствор гемцитабина готовили путем растворения субстанции в воде для инъекций. Липиды растворяли в хлороформе, полученный раствор переносили в круглодонную колбу. Органический растворитель удаляли на роторном испарителе при температуре водяной бани 44 °С и пониженном давлении, формируя тонкую липидную пленку. Для полного удаления остатков хлороформа пленку сушили в вакууме в течение 40 мин. Гидратацию проводили раствором гемцитабина в воде для инъекций (концентрация – 2,5 мг/мл) при температуре 44 °С и скорости вращения ротора 35 ± 5 об/мин в течение 1,5 ч. Полученные многослойные везикулы экструдировали через поликарбонатные мембраны с порами 0,4 мкм (1 раз) и 0,2 мкм (3 раза) для получения однородных одноламеллярных липосом. Неинкапсулированный в липосомы гемцитабин удаляли путем гель-фильтрации на колонках NAP-5.

Цитотоксическую активность липосомального гемцитабина исследовали в сравнении с раствором субстанции гемцитабина в воде для инъекций. Цитотоксичность раствора гемцитабина и липосом с гемцитабином в отношении клеточной линии РЛ А549 сравнивали в колориметрическом тесте (МТТ-анализе). Метод МТТ основан на оценке жизнеспособности клеток через метаболическую активность. МТТ представляет собой желтый водорастворимый краситель (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид), который в процессе метаболизма в клетках превращается в фиолетовые кристаллы формазана. Количество жизнеспособных клеток, полученное в результате этой реакции, соответствует интенсивности цвета и определяется фотометрическими измерениями после растворения кристаллов формазана.

Клеточную линию РЛ А549 (аденокарциномы легкого) культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), антибиотика пенициллина (25000 Ед) – стрептомицина (25000 мкг). Поддерживали стандартные условия культивирования: температуру 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Пассирование проводили после достижения клеточным слоем 80–90 % конfluence посредством обработки раствором Версена («ПанЭко», Россия) 1 раз в 3–4 дня.

Клетки линии А549 вносили в лунки 96-луночных планшетов в количестве 7×10^3 клеток на лунку, через 1 сут в лунки добавляли препараты в следующих концентрациях: 1 мМ; 100, 10, 1 мкМ; 100, 10 нМ. Клетки инкубировали с препаратами в течение 72 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. После завершения инкубации планшеты центрифугировали,

отбирали среду и в каждую лунку вносили ростовую среду, содержащую МТТ («ПанЭко», Россия) и оставляли в инкубаторе еще на 4 ч. Затем планшеты снова центрифугировали, отбирали супернатант и для растворения кристаллов формазана вносили в лунки по 150 мкл диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия), после чего планшеты встряхивали на шейкере для равномерного распределения окрашивания. Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуоферментных реакций Multiscan EX (Thermo Electron, Германия) при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Количество живых клеток вычисляли по формуле $N0 = N1/N2 \times 100 \%$, где N0 – процент живых клеток; N1 – средняя оптическая плотность в лунках, содержащих клетки и препарат; N2 – средняя оптическая плотность в контрольных лунках, содержащих только клетки.

Значения IC₅₀ – концентрации, подавляющей жизнеспособность 50 % клеток, – рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа с использованием программы GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США).

Результаты

В отношении клеточной линии РЛ А549 липосомальный гемцитабин оказался более цитотоксичным, чем раствор гемцитабина. На рис. 1 представлен график зависимости жизнеспособности клеток от концентрации препаратов.

С использованием кривых жизнеспособности клеток рассчитаны значения IC₅₀. Для липосомального гемцитабина IC₅₀ составила 0,47 мкМ, а для свободного гемцитабина – 9,6 мкМ. Это подтверждает более высокую эффективность препарата, содержащегося в липосомах, по сравнению с обычным лекарственным раствором.

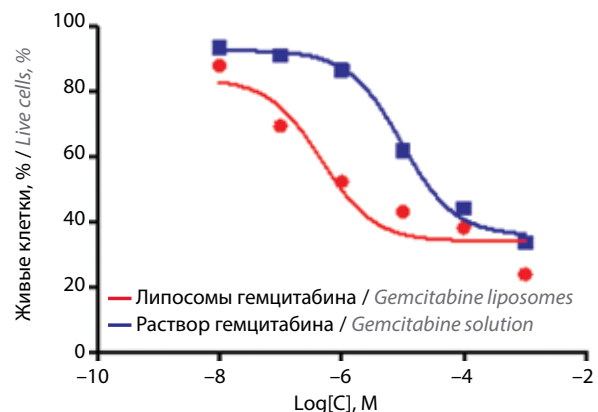


Рис. 1. Цитотоксическая активность липосомального гемцитабина и раствора гемцитабина

Fig. 1. Cytotoxic activity of liposomal gemcitabine and gemcitabine solution

Закключение

Проведенное исследование продемонстрировало, что липосомальная форма гемцитабина обладает значительно более высокой цитотоксической активностью в отношении клеточной линии РЛ А549 по сравнению с раствором свободного гемцитабина. Полученные результаты подчеркивают перспективность

липосомальной системы доставки гемцитабина для повышения эффективности химиотерапии и снижения системной токсичности препарата. Дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение терапевтической эффективности липосомального гемцитабина в условиях *in vivo* и оптимизацию состава для получения стабильной лекарственной формы.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Burris H.A. 3rd, Moore M.J., Andersen J. et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15(6):2403–13. DOI: 10.1200/JCO.1997.15.6.2403
- Heinemann V. Role of gemcitabine in the treatment of advanced and metastatic breast cancer. *Oncology* 2003;64(3):191–206. DOI: 10.1159/000069315
- Pokataev I.A., Lyadova M.A., Fedyanin M.Yu. et al. Toxicity and efficacy of the combination of gemcitabine and nab-paclitaxel (paclitaxel + albumin) in the Russian population of patients with pancreatic cancer: results of a multicenter retrospective study. *Malignant Tumors* 2019;9(3):20–30. DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-3-20-30
- Mirzaee E., Novin K., Fadavi P. et al. Intravesical gemcitabine for non-muscle invasive bladder cancer after bacillus calmette-guerin treatment failure: a prospective study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2024;25(9):3173–7. DOI: 10.31557/APJCP.2024.25.9.3173
- Berg T., Nøttrup T.J., Roed H. Gemcitabine for recurrent ovarian cancer – a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2019;155(3):530–7. DOI: 10.1016/j.ygyno.2019.09.026
- Valle J., Wasan H., Palmer D.H. et al.; ABC-02 Trial Investigators. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010;362(14):1273–81. DOI: 10.1056/NEJMoa0908721
- de Sousa Cavalcante L., Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol* 2014;741:8–16. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.041
- Khan M.F., Gottesman S., Boyella R., Juneman E. Gemcitabine-induced cardiomyopathy: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 2014;8:220. DOI: 10.1186/1752-1947-8-220
- Sabat C., Ginestet C., Chassagnon G. Gemcitabine and nab-paclitaxel induced interstitial pneumonia. *Diagn Interv Imaging* 2021;102(12):763–4. DOI: 10.1016/j.diii.2021.09.005
- Liang C., Shi S., Meng Q. et al. Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: where we are and where we are going. *Exp Mol Med* 2017;49(12):e406. DOI: 10.1038/emmm.2017.255
- Björn N., Jakobsen I., Udagawa C. et al. The association of four genetic variants with myelosuppression in gemcitabine-treated Japanese is not evident in gemcitabine/carboplatin-treated Swedes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2022;130(4):513–21. DOI: 10.1111/bcpt.13712
- Shi Y., van der Meel R., Chen X., Lammers T. The EPR effect and beyond: strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics* 2020;10(17):7921–4. DOI: 10.7150/thno.49577
- Shah S., Dhawan V., Holm R. et al. Liposomes: advancements and innovation in the manufacturing process. *Adv Drug Deliv Rev* 2020;154–155:102–22. DOI: 10.1016/j.addr.2020.07.002
- Оборотов Г.А., Дмитриева М.В., Колпаксиди А.П. и др. Перспективы создания липосомальной системы доставки гемцитабина. *Российский биотерапевтический журнал* 2025;24(1):46–56. DOI: 10.17650/1726-9784-2025-24-1-46-56
- Oborotov G.A., Dmitrieva M.V., Kolpaksidi A.P. et al. Prospects for the creation of a liposomal gemcitabine delivery system. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(1):46–56. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2025-24-1-46-56
- Higuchi T., Yokobori T., Takahashi R. et al. FF-10832 enables long survival via effective gemcitabine accumulation in a lethal murine peritoneal dissemination model. *Cancer Sci* 2019;110(9):2933–40. DOI: 10.1111/cas.14123
- Matsumoto T., Komori T., Yoshino Y. et al. Liposomal gemcitabine, FF-10832, improves plasma stability, tumor targeting, and antitumor efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer xenograft models. *Pharm Res* 2021;38(6):1093–106. DOI: 10.1007/s11095-021-03045-5

Вклад авторов

Г.А. Оборотов: обзор публикаций по теме статьи, получение экспериментальных данных, написание текста рукописи;

А.А. Рудакова: получение экспериментальных данных, редактирование статьи;

М.А. Барышникова: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

М.В. Дмитриева: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

И.И. Краснюк: анализ полученных данных, редактирование статьи.

Author's contributions

G.A. Oborotov: review of publications on the topic of the article, obtaining experimental data, writing the text of the manuscript;

A.A. Rudakova: obtaining experimental data, editing the manuscript;

M.A. Baryshnikova: development of the research design, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript;

M.V. Dmitrieva: development of the research design, review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;

I.I. Krasnyuk: analysis of the data obtained, editing the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Г.А. Оборотов / G.A. Oborotov: <https://orcid.org/0009-0001-5671-1923>

А.А. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

М.В. Дмитриева / M.V. Dmitrieva: <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>

И.И. Краснюк / I.I. Krasnyuk: <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. This study was performed without external funding.

Статья поступила: 26.03.2025. Принята к публикации: 30.05.2025. Опубликована онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 26.03.2025. Accepted for publication: 30.05.2025. Published online: 27.06.2025.