

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 57.04

doi: 10.17223/19988591/44/6

С.В. Луценко¹, Е.Г. Черемных², Н.Е. Седякина¹,
Н.Т. Молдогазиева¹, Т.И. Громовых¹, Н.Б. Фельдман¹

¹Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской
Федерации (Сеченовский университет), г. Москва, Россия

²Научный центр психического здоровья, г. Москва, Россия

Исследование биологической активности липосомного сангвинарина на культурах опухолевых клеток и простейших

Работа выполнена при поддержке проекта повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Получена липосомная форма сангвинарина на основе лецитина и холестерина, характеризующаяся средним размером частиц $108,5 \pm 2,2$ нм, дзета-потенциалом $-34,7 \pm 1,4$ мВ и способностью к пролонгированному высвобождению действующего вещества. Проведено исследование активности липосомного сангвинарина на культурах опухолевых клеток и клеток простейших. Липосомная форма сангвинарина обладала цитотоксической активностью, близкой к активности свободного вещества, в отношении опухолевых клеток карциномы молочной железы человека линии MCF-7 (IC_{50} 14,5 и 9,4 мкМ соответственно). Минимальная подавляющая концентрация липосомного сангвинарина в отношении инфузорий *P. caudatum* составляла 0,49 мкМ. Препарат оказывал выраженное стимулирующее действие на процесс тромбообразования, а также функциональную активность системы комплемента в отношении инфузорий *T. pyriformis*, в 2 раза сокращая время их полужизни в сыворотке крови. Полученные результаты позволяют рассматривать липосомный сангвинарин в качестве перспективного противоопухолевого и антипротозойного средства.

Ключевые слова: сангвинарин; липосомы; противоопухолевая активность; карцинома MCF-7; тромбообразование; антипротозойная активность; *Paramecium caudatum*; *Tetrahymena pyriformis*.

Введение

Сангвинарин представляет собой бензофенантридиновый алкалоид, содержащийся в растениях семейства Маковых (Papaveraceae). С точки зрения применения в медицине привлекательными особенностями сангвинарина являются его относительно низкая токсичность [1, 2] и плюри-

потентность действия. Сангвинарин обладает противомикробной [3, 4], противовирусной [5], противопаразитарной [6–8], противовоспалительной [9], антитромбоцитарной [10], антиангиогенной [11] и противоопухолевой активностью [12]. Одним из важных свойств сангвинарина является выраженная способность к подавлению тромбообразования, опухолевого роста и метастазирования. Сангвинарин проявляет антитромбоцитарное действие путем подавления адгезии и агрегации тромбоцитов [13]. Ингибирование циклооксигеназы служит одним из путей подавления тромбообразования, например, с помощью ацетилсалициловой кислоты, которая необратимо ингибирует циклооксигеназу тромбоцитов и эндотелиальных клеток, подавляя образование тромбоксана А₂ [14, 15]. В то же время аспирин подавляет образование в эндотелиальных клетках простаглицина, который предотвращает агрегацию тромбоцитов и вызывает вазодилатацию. Тромбоксан А₂ синтезируется активированными тромбоцитами и стимулирует активацию новых тромбоцитов, а также их агрегацию. Активная форма тромбоксана А₂ крайне неустойчива и способна самопроизвольно превращаться в неактивный метаболит – тромбоксан В₂. Период полураспада тромбоксана А₂ в организме человека составляет 30 с [16]. Показано, что в концентрации 5–10 мкМ сангвинарин ингибирует образование тромбоксана В₂, но не подавляет агрегацию тромбоцитов, индуцируемую высокими концентрациями сериновой протеазы тромбина [17]. Сангвинарин также ингибирует циклооксигеназу-1 (IC₅₀ 28 мкМ), но оказывает незначительный ингибирующий эффект на циклооксигеназу-2. Циклооксигеназы играют важную роль не только в тромбообразовании, но и в гомеостазе пищеварительного тракта, механизмах боли и воспалительных реакций организма [16]. Циклооксигеназа-1, являющаяся мишенью действия сангвинарина, также играет важную роль в патологическом ангиогенезе и злокачественной трансформации клеток молочной железы [18], поэтому изучение противоопухолевого действия сангвинарина в отношении клеток карциномы молочной железы имеет важное значение. Помимо циклооксигеназы-1, описаны и другие мишени противоопухолевого действия сангвинарина. Так, сангвинарин способен индуцировать апоптоз опухолевых клеток посредством активации каспазы 3 и подавления экспрессии Bcl-2 [19]. В клетках рака предстательной железы сангвинарин блокирует клеточный цикл путем индукции повышения уровня экспрессии ингибиторов циклинзависимых протеинкиназ и подавления экспрессии циклинзависимых протеинкиназ 2, 4 и 6 [20]. Также показано значительное ингибирование индуцированных тканевым полипептидным антигеном (ТРА) инвазии и миграции клеток рака молочной железы [21]. Такой ингибирующий эффект сангвинарина имеет особо важное значение, поскольку клетки рака молочной железы активно метастазируют в дистальные органы (печень, легкие, лимфатические узлы, кости), что является одной из главных причин высокой смертности пациентов с данным онкологическим заболеванием.

Таким образом, исследование модулирующего влияния сангвинарина на процессы тромбообразования и злокачественный рост, а также разработка эффективных транспортных терапевтических систем имеют большое практическое значение, поскольку возможности его применения в свободном виде ограничены вследствие низкой растворимости в биологических жидкостях. Представленные в литературе сведения о противоопухолевой активности липосомных форм сангвинарина весьма скромны, а сведения об антитромботической активности не представлены вовсе. В настоящее время продолжает быть актуальным поиск новых и совершенствование имеющихся систем транспорта терапевтических агентов широкого спектра действия, а также изучение новых мишеней для таких препаратов. В данной работе была получена, очищена и охарактеризована липосомная форма сангвинарина на основе лецитина и холестерина. С целью расширения потенциальных сфер терапевтического применения липосомного сангвинарина была исследована его противоопухолевая активность в отношении клеток карциномы молочной железы, а также влияние на тромбообразование. Биологическая активность липосомного сангвинарина была исследована в отношении клеток простейших – *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*.

Материалы и методики исследований

В работе использовали сангвинарин, холестерин, фосфатно-солевой буфер, глюкозу, пептон, дрожжевой экстракт, триэтаноламин, Сефадекс G-50, NaCl, NaHCO₃, KCl, MgSO₄, CaCl₂ (Merck, Германия), лецитин (AppliChem, Германия). Остальные реактивы имели квалификацию «ч.д.а.».

Липосомы получали методом гидратации тонкослойной пленки буфером с последующей обработкой дисперсии ультразвуком. К смеси лецитина и холестерина в хлороформе (молярное соотношение 3:1) добавляли 0,4% раствор сангвинарина в метаноле. Смесь хлороформа с метанолом удаляли на ротонном испарителе, продували высушенные липиды азотом и ресуспендировали в 40 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. Суспензию подвергали обработке ультразвуком в течение 5 мин при 50°C с помощью ультразвукового дезинтегратора «Misonix sonicator S-4000» при амплитуде 60%. После фильтрации на фильтре с размером пор 0,45 мкм липосомный препарат подвергали 11-кратной экструзии через поликарбонатную мембрану с размером пор 100 нм с помощью ручного экструдера Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США).

Очистку липосомной дисперсии от не включившегося в везикулы препарата проводили на колонке с Сефадекс G50, уравновешенным 40 мМ фосфатно-солевым буферным раствором, pH 7,4. Элюирование препарата липосом проводили тем же буферным раствором при скорости потока 2 мл/мин, под контролем УФ-детектора при длине волны λ 275 нм. Фракции, содержащие липосомный препарат, объединяли и использовали в дальнейших экспериментах.

Для определения эффективности инкапсулирования сангвинарина в липосомы к 100 мкл препарата липосом после диализа добавляли 200 мкл метанола, перемешивали и подвергали обработке ультразвуком в течение 5 мин. Затем образец центрифугировали и отбирали 100 мкл супернатанта для ВЭЖХ-анализа, который проводили с помощью хроматографа Agilent Technologies 1260 Infinity (США) на обращеннофазовой колонке С18. Подвижная фаза состояла из смеси водного (10%) ацетонитрила и трифторуксусной кислоты (0,1%); скорость потока составляла 1 мл/мин. Присутствующий в элюате с колонки сангвинарин определяли при длине волны λ 275 нм. С помощью стандартного образца сангвинарина строили калибровочный график, по которому определяли концентрацию сангвинарина. Эффективность включения сангвинарина в липосомы (E) рассчитывали по формуле $E = (m_n / m_o) \cdot 100\%$, где m_n – количество сангвинарина в липосомах, мг; m_o – общее количество сангвинарина, мг.

Изучение формы и размеров полученных липосомных частиц осуществляли на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6490LV (Япония). Исследуемые пробы покрывались 20 нм (40 с при 40 мА) слоем платины в автоматическом коутере JEOL JFC-1600. Определение размеров частиц и дзета-потенциала проводили методом динамического рассеяния света или фотонной корреляционной спектроскопии на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания).

Изучение динамики высвобождения сангвинарина проводили с помощью модифицированного метода диализа [22]. Препарат липосом (20 мл) в диализном мешке помещали в термостатируемый шейкер и диализировали при 37°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании (50 об/мин) против фосфатно-солевого буфера (рН 7,4), содержащего 1% метанола. В качестве контроля использовали свободный сангвинарин, который диализировали в аналогичных условиях. Образцы отбирали для анализа через определенные промежутки времени, добавляя к исходному диализному раствору тот же объем свежего буфера. Содержание сангвинарина в диализате определяли с помощью обращеннофазовой ВЭЖХ.

В работе использовали опухолевые клетки карциномы молочной железы человека линии MCF-7. Клетки культивировали в пластиковых флаконах (Corning, США) в среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 100 мкг/мл стрептомицина, в увлажненной атмосфере 5%-ного CO₂ в инкубаторе СВ 53 (Binder GmbH, Германия) при 37°C. За 1 сут до эксперимента клетки рассеивали в 96-луночные планшеты для микротитрования (Corning, США) в среде для культивирования в плотности 5000–7000 клеток в лунку. Инкубировали клетки с растворами исследуемых препаратов в различных концентрациях в стандартных условиях 72 ч, после чего определяли выживаемость клеток с помощью МТТ-теста [23]. ЦТА препарата выражали в единицах IC₅₀ (молярная концентрация препарата, вызывающая гибель 50% клеток).

Оценку токсичности и биологического действия липосомного сангвинарина на клетки простейших проводили на приборе «БиоЛаТ» (Россия), имеющем в своем составе две видеокамеры, передающие изображения лунок планшета в компьютер, где полученные данные обрабатываются с помощью управляющей программы AutoCiliata, которая, в зависимости от варианта исследования, подсчитывает количество клеток или регистрирует изменения яркости в реакционной смеси [24].

В работе использовали лабораторные культуры клеток простейших *Paramecium caudatum* Ehrenberg и *Tetrahymena pyriformis* WH1 из коллекции Научного центра психического здоровья (ФГБНУ НЦПЗ, г. Москва). Клетки *P. caudatum* культивировали при температуре 25°C в чашках Петри на среде, содержащей 0,01% NaCl, 0,002% MgSO₄, 0,002% CaCl₂, 0,001% KCl, 0,001% NaHCO₃, с добавлением сухих дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Клетки *T. pyriformis* культивировали при 25°C на стерильной синтетической среде, содержащей 0,5% пептона, 0,5% глюкозы, 0,1% дрожжевого экстракта, 0,1% NaCl.

Минимальную подавляющую концентрацию липосомного сангвинарина определяли на инфузориях *P. caudatum* по тест-реакции гибели клеток в присутствии препарата в различных концентрациях [24]. В лунки планшета прибора «БиоЛаТ» вводили инфузории *P. caudatum* в среде культивирования. Включали команду подсчета клеток в заданных лунках и вводили препарат липосомного сангвинарина в исследуемых концентрациях. В течение 2 ч эксперимента через заданные промежутки времени оценивали выживаемость клеток в лунках с разной концентрацией препарата.

Оценку биологического действия сангвинарина на инфузорий *T. pyriformis* проводили по тест-реакции роста культуры при низкой заведомо нетоксичной для простейших концентрации препарата – 60 нг/мл. В лунки планшета прибора «БиоЛаТ» вносили 300–400 клеток *T. pyriformis* и препарат в указанной концентрации. Контролем служила дистиллированная вода. Эксперимент продолжали в течение 24 ч. Коэффициент пролиферации клеток (K_n) рассчитывали по формуле $K_n = N_1/N_0$, где N_1 – количество живых инфузорий после экспозиции в пробе, N_0 – количество живых инфузорий до начала этапа опыта.

Для оценки влияния липосомного сангвинарина на тромбообразование регистрировали размер и время начала образования сгустка в плазме крови с добавлением препарата и без него (контроль) [25]. В лунки планшета прибора «БиоЛаТ» вводили по 260 мкл буфера (0,1 М триэтаноламин, 1,5 мМ MgCl₂, 2,5 мМ CaCl₂) и 10 мкл липосомного сангвинарина (конечная концентрация сангвинарина в лунке составляла 600 нг/мл). В контрольные образцы вместо препарата вносили по 10 мкл дистиллированной воды. После оценки первоначальной яркости кадров всех заданных лунок планшета в них вводили по 30 мкл цитратной плазмы (пул из плазмы 10 здоровых доноров) и оценивали изменения яркости кадров. Влияние липосомного сангвинарина на тромбообразование оценивали по времени начала тромбообразования и плотности образуемого сгустка, соответствующей яркости кадра.

Действие липосомного сангвинарина на систему комплемента в сыворотке крови оценивали по времени гибели половины клеток-мишеней *T. pyriformis* [26]. В лунки планшета прибора вводили 260 мкл буфера, 10 мкл препарата (концентрация 60 нг/мл), 15 мкл разведенной в 4 раза сыворотки (пул из сывороток 10 здоровых доноров) и 15 мкл культуры инфузорий *T. pyriformis*. В контрольные лунки вводили те же компоненты, но вместо раствора препарата – 10 мкл дистиллированной воды. С помощью прибора «БиоЛаТ» оценивали изменение количества клеток в заданных лунках.

Обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ AutoCiliata и Microsoft Excel 2010 (при анализе данных, полученных с прибора «БиоЛаТ»), а также программы Microcal Origin 6.0. Для выявления статистической значимости отличий использовали критерий Стьюдента; данные считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Полученные методом гидратации тонкослойной пленки (лецитин-холестерин-сангвинарин), обработанные ультразвуком и очищенные с помощью гель-фильтрации липосомы представляли собой наноразмерные частицы сферической формы, по данным электронной микроскопии (рис. 1).

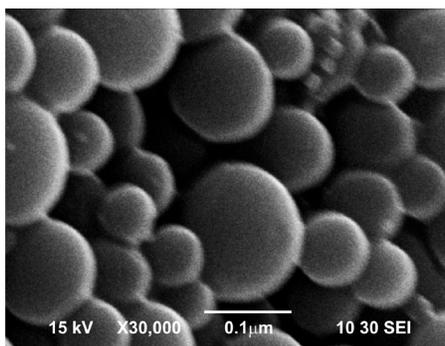


Рис. 1. Микрофотография липосомных частиц с сангвинарином, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Автор фотографии – Н.Е. Седякина

[Fig. 1. A micrograph of liposome particles with sanguinarine obtained using a scanning electron microscope. Photo by NE Sedyakina]

Средний размер полученных липосомных частиц с включенным в их состав сангвинарином, определенный с помощью метода динамического рассеяния света, составлял $108,5 \pm 2,2$ нм, дзета-потенциал $-34,7 \pm 1,4$ мВ. Эффективность включения сангвинарина в липосомы была достаточно высокой и составляла $72,8 \pm 4,8\%$. Ранее было продемонстрировано, что наночастицы образуют стабильные дисперсии, если значения их дзета-потенциала составляют ± 30 мВ и выше [27]. Дзета-потенциал полученных частиц

($-34,7 \pm 1,4$) отвечает данному критерию и позволяет предполагать достаточно высокую стабильность их дисперсии.

Исследование динамики высвобождения сангвинарина из липосом проводили при условиях, приближенных к физиологическим (рН 7,4; 37°C). Как видно из рис. 2, высвобождение сангвинарина из липосомного препарата происходило с наиболее высокой скоростью в первые 2 ч инкубации. В последующий период процесс высвобождения постепенно замедлялся, и после 24 ч инкубации высвобождение остаточного сангвинарина происходило довольно медленно, что может быть связано с его мембранной локализацией в липосомах. После 6 ч инкубации наблюдалось высвобождение из липосом более 50% сангвинарина, а после 70 ч инкубации высвобождалось около 93% сангвинарина. Таким образом, в целом высвобождение сангвинарина из липосом носит прологированный характер. При этом наблюдается достаточно полное высвобождение препарата (через 3 сут инкубации высвобождается более 94% сангвинарина).

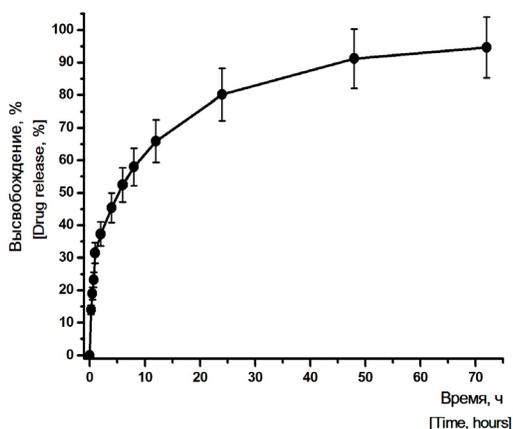


Рис. 2. Динамика высвобождения сангвинарина из липосомной дисперсии
[Fig. 2. Dynamics of sanguinarine release from liposomal dispersion]

Противоопухолевая активность липосомного сангвинарина была продемонстрирована ранее *in vitro* на культурах опухолевых клеток линий В16 и HeLa [28]. В связи с широким распространением среди населения опухолей молочной железы и актуальностью поиска новых эффективных противоопухолевых средств мы исследовали цитотоксическую активность липосомного сангвинарина в отношении культуры клеток карциномы молочной железы линии MCF-7.

Результаты исследования цитотоксической активности липосомного сангвинарина в отношении опухолевых клеток линий MCF-7 представлены на рис. 3. Липосомный сангвинарин проявлял дозозависимую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток исследуемой линии в

микромольном диапазоне концентраций. ЦТА липосомного сангвинарина (IC_{50} 14,5 мкМ) была несколько ниже активности свободного сангвинарина (IC_{50} 9,4 мкМ), что может объясняться пролонгированным характером высвобождения сангвинарина из липосом в клеточную среду, а также спецификой компартментализации и внутриклеточного высвобождения препарата при его поглощении опухолевыми клетками путем эндоцитоза. Пролонгированное высвобождение и свойство преимущественного накопления липосом в опухолевой ткани могут оказать положительное влияние на терапевтическую эффективность при применении липосомного сангвинарина *in vivo*.

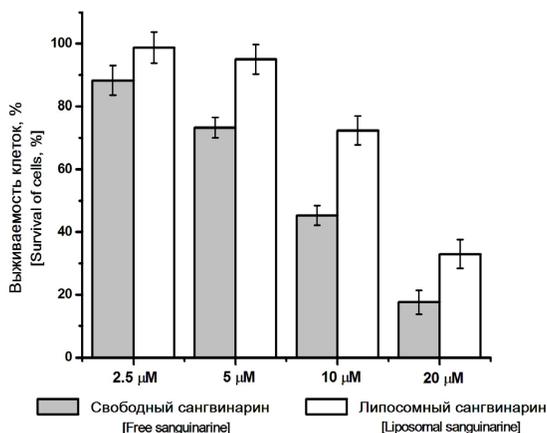


Рис. 3. Цитотоксическая активность липосомного и свободного сангвинарина в отношении опухолевых клеток карциномы молочной железы человека линии MCF-7 ($p < 0,05$ для концентраций 5–20 мкМ)
[Fig. 3. Cytotoxic activity of liposomal and free sanguinarine against tumor cells of human breast carcinoma MCF-7 ($p < 0.05$ for concentrations of 5–20 μM)]

Таким образом, липосомный сангвинарин может рассматриваться в качестве перспективной основы для создания противоопухолевых препаратов.

Ранее было показано, что липосомный сангвинарин оказывает антибактериальное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых микромицетов, что может свидетельствовать о возможности его практического применения в качестве антимикробного средства [29]. Исследований цитотоксической активности липосомного сангвинарина на клетках инфузорий не проводилось, хотя такого рода исследования представляются весьма актуальными, поскольку они позволяют оценить действие сангвинарина на простейшие эукариотические организмы, среди которых встречается также немало возбудителей болезней человека [30–32].

Результаты эксперимента по оценке влияния липосомного сангвинарина на выживаемость инфузорий *P. caudatum* представлены на рис. 4.

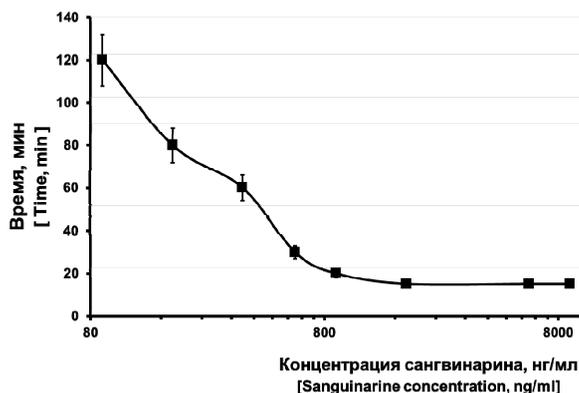


Рис. 4. Зависимость времени жизни клеток *Paramecium caudatum* от концентрации липосомного сангвинарина

[Fig. 4. The dependence of the lifetime of *Paramecium caudatum* cells on the concentration of liposomal sanguinarine]

Как видно из рис. 4, влияние липосомного сангвинарина на время жизни *P. caudatum* носило дозозависимый характер. В условиях эксперимента минимальная подавляющая концентрация липосомного сангвинарина составила 0,49 мкМ. При концентрациях от 0,245 мкМ и ниже препарат не вызывал гибели клеток в течение 2 ч; в течение последующих 24 ч также не наблюдалось гибели инфузорий. Таким образом, липосомный сангвинарин оказывает выраженное цитотоксическое действие в отношении представителя простейших (*Protozoa*) эукариотических одноклеточных организмов – *P. caudatum*, что может послужить основой для разработки антипротозойных препаратов. Для выявления видового спектра уязвимых к действию липосомного сангвинарина патогенных *Protozoa* требуются дополнительные исследования.

Также была проведена оценка влияния липосомного сангвинарина на защитные системы крови – коагуляцию и систему комплемента. Оценка влияния липосомного сангвинарина на тромбообразование *in vitro* проводили в цитратной плазме после ее рекальцификации. После оценки первоначальной яркости кадров всех заданных лунок планшета в них вводили по 30 мкл цитратной плазмы (пул из плазмы 10 здоровых доноров) и оценивали изменения яркости кадров. Влияние липосомного сангвинарина на тромбообразование оценивали по времени начала тромбообразования и плотности образующегося сгустка, соответствующей яркости кадра. Фотографии, иллюстрирующие динамику образования сгустков, приведены на рис. 5, а. Средние значения изменения яркостей кадров, соответствующие величинам образующихся сгустков, приведены на рис. 5, б.

Как видно из рис. 5, размер сгустка в растворах плазмы с добавлением липосомного сангвинарина существенно меньше по сравнению с контролем. При этом липосомный сангвинарин индуцирует образование сгустка

после 7 мин инкубации, тогда как в контроле образование сгустка начинается лишь после 14 мин инкубации. Таким образом, в условиях данного эксперимента липосомный сангвинарин оказывает выраженное стимулирующее действие в отношении тромбообразования. Ранее было показано, что свободный сангвинарин проявляет антитромбоцитарное действие путем ингибирования активности циклооксигеназы-1 (IC_{50} 28 мкМ), играющей важную роль в тромбообразовании, и подавления образования тромбксана В2 [17]. Стимуляция тромбообразования липосомным сангвинарином может быть обусловлена как прямой активацией ферментов коагуляции, так и индукцией ферментативных реакций системы коагуляции, которые могут эффективно протекать на поверхности липосомных наночастиц. Обнаруженный эффект стимуляции тромбообразования липосомными частицами представляется важным с точки зрения необходимости его учета при расчете доз вводимого в кровотоки препарата.

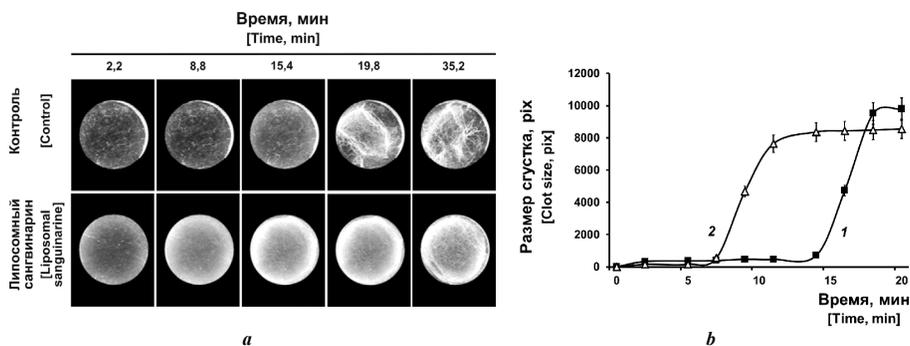


Рис. 5. Влияние липосомного сангвинарина в концентрации 600 нг/мл на процесс тромбообразования в плазме крови *in vitro*. *a* – фотографии лунок прибора «БиоЛат», содержащие контрольные и опытные пробы; *b* – динамика образования сгустков в плазме крови в контроле и в присутствии препарата липосомного сангвинарина (1 – контроль, 2 – липосомный сангвинарин).

Автор фотографии – Е.Г. Черемных

[Fig. 5. The effect of liposomal sanguinarine at a concentration of 600 ng/ml on the process of thrombus formation in blood plasma *in vitro*. *a* - Photographs of the wells of the "BioLat" device, containing control and test samples; *b* - Dynamics of thrombus formation in blood plasma in the control (1) and in the presence of liposomal sanguinarine (2). Photo by EG Cheremnykh]

Протозойные инфекции – вызываемые паразитическими простейшими заболевания – могут приводить к серьезным последствиям, вплоть до летального исхода. Как важный элемент иммунной системы организма система комплемента осуществляет неспецифическую защиту от протозойной инфекции. При проникновении в организм паразитических простейших происходит инициация цепи последовательных реакций, приводящих к образованию компонентами системы комплемента на клеточной поверхности

так называемого мембраноатакующего комплекса, действие которого приводит к лизису клетки. Мы исследовали влияние липосомного сангвинарина на возможность инициирования гибели клеток простейших путем активации системы комплемента в крови. Для этого в модельном эксперименте инфузории инкубировались в среде, содержащей сыворотку крови, в присутствии нетоксичной для них концентрации липосомного сангвинарина.

На рис. 6 приведены результаты исследования влияния липосомного сангвинарина в нетоксичной концентрации 60 нг/мл на функциональную активность системы комплемента в отношении инфузорий *T. pyriformis*. Как видно из рис. 6, время полужизни инфузорий-мишени системы комплемента (T_{50} 21,7 мин) в среде, содержащей сыворотку крови и липосомный сангвинарин, сокращалось по сравнению с контролем (T_{50} 41,6 мин) примерно в два раза. Это может свидетельствовать об активирующем действии липосомного сангвинарина в отношении сборки мембраноатакующего комплекса системы комплемента на поверхности клеток *T. pyriformis*, вызывающего их гибель. В отсутствие сыворотки крови в образцах липосомный сангвинарин в концентрации 60 нг/мл, напротив, оказывал стимулирующее действие в отношении роста *T. pyriformis* – значение коэффициента пролиферации для нативных клеток составляло $2,1 \pm 0,2$, для обработанных препаратом клеток – $6,4 \pm 0,8$ ($p < 0,05$).

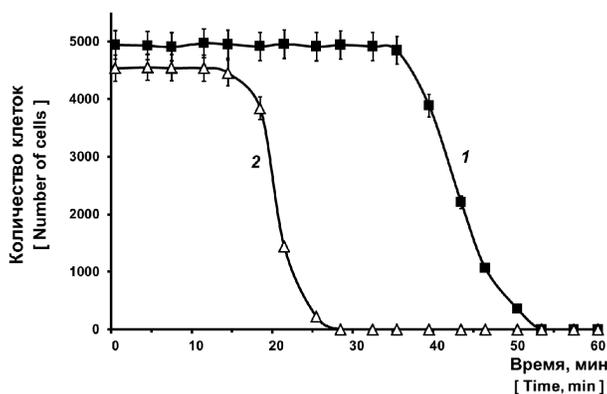


Рис. 6. Динамика гибели клеток *Tetrahymena pyriformis* – мишени системы комплемента – в среде, содержащей сыворотку крови, в присутствии липосомного сангвинарина: 1 – контроль, 2 – липосомный сангвинарин в концентрации 60 нг/мл
[Fig. 6. Dynamics of *Tetrahymena pyriformis* cell death - complement system targets - in a medium containing serum in the presence of liposomal sanguinarine.
 1 - control, 2 - liposomal sanguinarine at a concentration of 60 ng/ml]

Представленные данные свидетельствуют о возможности стимулирующего влияния липосомного сангвинарина на систему комплемента. Данный эффект позволяет рассматривать перспективу использования липосомного сангвинарина в качестве иммуностимулирующего средства.

Заключение

Липосомы с сангвинарином, полученные методом гидратации тонко-слоистой пленки на основе лецитина и холестерина, взятых в молярном соотношении 3:1, обладали небольшим размером и проявляли способность к пролонгированному высвобождению действующего вещества. Продемонстрированная в экспериментах *in vitro* выраженная цитотоксическая противоопухолевая и антипротозойная активность липосомного сангвинарина позволяет рассматривать его в качестве перспективного противоопухолевого и антипротозойного средства. Обнаруженный эффект стимуляции тромбообразования липосомным сангвинарином представляется важным с точки зрения необходимости его учета при выборе дозы вводимого в кровоток препарата.

Литература

1. Kosina P., Walterová D., Ulrichová J., Lichnovský V., Stiborová M., Rýdlová H., Vicar J., Krecman V., Brabec M.J., Simánek V. Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment // Food and Chemical Toxicology. 2004. Vol. 42. PP. 85–91. doi: [10.1016/j.fct.2003.08.007](https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.007)
2. Zdarilova A., Vrublova E., Vostalova J., Klejdus B., Stejskal D., Proskova J., Kosina P., Svobodova A., Vecera R., Hrbac J., Cernochova D., Vicar J., Ulrichova J., Simanek V. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment // Food and Chemical Toxicology. 2008. Vol. 46. PP. 3721–3726. doi: [10.1016/j.fct.2008.09.054](https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.054)
3. Miao F., Yang X.J., Zhou L., Hu H.J., Zheng F., Ding X.D., Sun D.M., Zhou C.D., Sun W. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity // Natural Product Research. 2011. Vol. 25. PP. 863–875. doi: [10.1080/14786419.2010.482055](https://doi.org/10.1080/14786419.2010.482055)
4. Yang X.J., Miao F., Yao Y., Cao F.J., Yang R., Ma Y.N., Qin B.F., Zhou L. *In vitro* antifungal activity of sanguinarine and chelerythrine derivatives against phytopathogenic fungi // Molecules. 2012. Vol. 17. PP. 13026–13035. doi: [10.3390/molecules171113026](https://doi.org/10.3390/molecules171113026)
5. Tan G.T., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., Hughes S.H. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase // Journal of Natural Products. 1991. Vol. 54. PP. 143–154. doi: [10.1021/np50073a012](https://doi.org/10.1021/np50073a012)
6. Miao F., Yang X.J., Ma Y.N., Zheng F., Song X.P., Zhou L. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their *in vitro* acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi* // Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo) 2012. Vol. 60. PP. 1508–1513. doi: [10.1248/cpb.c12-00618](https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00618)
7. Yao J.-Y., Li X.-L., Shen J.-Y., Pan X.-Y., Hao G.-J., Xu Y., Ying W.-L., Ru H.-S., Liu X.-L. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* L. with activity against *Trichodina* sp. // Aquaculture. 2011. Vol. 318. PP. 235–238. doi: [10.1016/j.aquaculture.2011.04.035](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.035)
8. Wang G.X., Zhou Z., Jiang D.X., Han J., Wang J.F., Zhao L.W., Li J. In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus* // Veterinary Parasitology. 2010. Vol. 171. PP. 305–313. doi: [10.1016/j.vetpar.2010.03.032](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.032)
9. Lenfeld J., Kroutil M., Marsálek E., Slavík J., Preininger V., Simánek V. Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* // Planta Medica. 1981. Vol. 43. PP. 161–165. doi: [10.1055/s-2007-971493](https://doi.org/10.1055/s-2007-971493)

10. Tsai I.L., Wun M.F., Teng C.M., Ishikawa T., Chen I.S. Anti-platelet aggregation constituents from Formosan *Toddalia asiatica* // *Phytochemistry*. 1998. Vol. 48. PP. 1377–1382. doi: [10.1016/S0031-9422\(97\)00678-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00678-X)
11. Xu J.Y., Meng Q.H., Chong Y., Jiao Y., Zhao L., Rosen E.M., Fan S. Sanguinarine is a novel VEGF inhibitor involved in the suppression of angiogenesis and cell migration // *Molecular and Clinical Oncology*. 2013. Vol. 1, № 2. PP. 331–336. doi: [10.3892/mco.2012.41](https://doi.org/10.3892/mco.2012.41)
12. Gaziano R., Moroni G., Buè C., Miele M.T., Sinibaldi-Vallebona P., Pica F. Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine: Evidence and perspectives // *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2016. Vol. 8. PP. 30–39. doi: [10.4251/wjgo.v8.i1.30](https://doi.org/10.4251/wjgo.v8.i1.30)
13. Maseri A., Cianflone D. Inflammation in acute coronary syndromes // *European Heart Journal Supplements*. 2002. Vol. 4 (Suppl. B). PP. B8–B13. doi: [10.1016/S1520-765X\(02\)90009-X](https://doi.org/10.1016/S1520-765X(02)90009-X)
14. Baigent C., Blackwell L., Collins R., Emberson J., Godwin J., Peto R., Buring J., Hennekens C., Kearney P., Meade T., Patrono C., Roncaglioni M.C., Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials // *Lancet*. 2009. Vol. 373. PP. 1849–1860. doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)60503-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60503-1)
15. Patrono C., García Rodríguez L.A., Landolfi R., Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis // *The New England Journal of Medicine*. 2005. Vol. 353. PP. 2373–2383. doi: [10.1056/NEJMr052717](https://doi.org/10.1056/NEJMr052717)
16. Simmons D.L., Botting R.M., Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition // *Pharmacological Reviews*. 2004. Vol. 56. PP. 387–437. doi: [10.1124/pr.56.3.3](https://doi.org/10.1124/pr.56.3.3)
17. Jeng J.H., Wu H.L., Lin B.R., Lan W.H., Chang H.H., Ho Y.S., Lee P.H., Wang Y.J., Wang J.S., Chen Y.J., Chang M.C. Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production // *Atherosclerosis*. 2007. Vol. 191. PP. 250–258. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.023](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.023)
18. Lavalley G.E., Bertagnolli A.C., Tavares W.L., Cassali G.D. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival // *Veterinary Pathology*. 2009. Vol. 46. PP. 1275–1280. doi: [10.1354/vp.08-VP-0226-C-FL](https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0226-C-FL)
19. Han M.H., Yoo Y.H., Choi Y.H. Sanguinarine-induced apoptosis in human leukemia U937 cells via Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation // *Chemotherapy*. 2008. Vol. 54. PP. 157–165. doi: [10.1159/000140359](https://doi.org/10.1159/000140359)
20. Adhami V.M., Aziz M.H., Reagan-Shaw S.R., Nihal M., Mukhtar H., Ahmad N. Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004. Vol. 3. PP. 933–940.
21. Park S.Y., Jin M.L., Kim Y.H., Lee S.J., Park G. Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression // *Oncology Reports*. 2014. Vol. 31. PP. 497–504. doi: [10.3892/or.2013.2843](https://doi.org/10.3892/or.2013.2843)
22. Zhang X., Lu S., Han J., Sun S., Wang L., Li Y. Preparation, characterization and *in vivo* distribution of solid lipid nanoparticles loaded with syringopicroside // *Pharmazie*. 2011. Vol. 66. PP. 404–407. doi: [10.1691/ph.2011.0350](https://doi.org/10.1691/ph.2011.0350)
23. Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam G.S., Coussens N.P., Brimacombe K., et al., eds. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
24. Черемных Е.Г., Кулешин А.В., Кулешина О.Н. Биотестирование пищевых добавок на инфузориях // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности*. 2011. № 3. С. 5–12. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=16757361>

25. Kuleshina O.N., Kozlov L.V., Cheremnykh E.G. A universal method for measuring functional activity of complement in humans, laboratory, domestic, and agricultural animals, amphibians, and birds // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014. Vol. 157, № 2. PP. 285–287. doi: [10.1007/s10517-014-2546-5](https://doi.org/10.1007/s10517-014-2546-5)
26. Ivanov P.A., Faktor M.I., Karpova N.S., Cheremnykh E.G., Brusov O.S. Complement-mediated death of ciliate *Tetrahymena pyriformis* caused by human blood serum // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016. Vol. 160, №6. PP. 775–778. doi: [10.1007/s10517-016-3307-4](https://doi.org/10.1007/s10517-016-3307-4)
27. Riddick T.M., Zeta-Meter, Inc. Control of colloid stability through zeta potential: with a closing chapter on its relationship to cardiovascular disease. Livingston Pub. Co., 1968. 372 p.
28. Feldman N.B., Kuryakov V.N., Sedyakina N.E., Gromovykh T.I., Lutsenko S.V. Preparation of liposomes containing benzophenanthridine alkaloid sanguinarine and evaluation of its cytotoxic activity // *International Journal of Nanotechnology*. 2018. Vol. 15, № 4/5. PP. 280–287. doi: [10.1504/IJNT.2018.094785](https://doi.org/10.1504/IJNT.2018.094785)
29. Луценко С.В., Громовых Т.И., Каширин В.В., Курьяков В.Н., Баранова А.А., Садыкова В.С., Фельдман Н.Б. Исследование *in vitro* противоопухолевой и антимикробной активности препарата пэгиллированных липосом с сангвинарином // *Антибиотики и химиотерапия*. 2018. Т. 63, № 3–4. С. 3–7.
30. Stanley S.L. Jr. Amoebiasis // *Lancet*. 2003. Vol. 361, №9362. PP. 1025–1034. doi: [10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)
31. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives // *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2004. Vol. 27, №5. PP. 305–318. doi: [10.1016/j.cimid.2004.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004)
32. Nimir A.R., Saliem A., Ibrahim I.A. Ophthalmic parasitosis: a review article // *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012. Article 587402. doi: [10.1155/2012/587402](https://doi.org/10.1155/2012/587402)

*Поступила в редакцию 24.09.2018 г.; повторно 21.11.2018 г.;
принята 05.12.2018 г.; опубликована 27.12.2018 г.*

Авторский коллектив:

Луценко Сергей Викторович – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой биотехнологии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

E-mail: svlutsenko57@mail.ru

Черемных Елена Григорьевна – канд. техн. наук, доцент, с.н.с. лаборатории клинической биохимии, Научный центра психического здоровья (115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34).

E-mail: elcher10@yandex.ru

Седякина Наталья Евгеньевна – канд. хим. наук, доцент кафедры, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

E-mail: nsedyakina@mail.ru

Молдогазиева Нурбубу Тентиевна – д-р биол. наук, профессор кафедры биотехнологии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

E-mail: nmoldogazieva@mail.ru

Громовых Татьяна Ильинична – д-р биол. наук, профессор кафедры биотехнологии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

E-mail: gromovykh.tatyana@mail.ru

Фельдман Наталия Борисовна – д-р биол. наук, профессор кафедры биотехнологии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

E-mail: n_feldman@mail.ru

For citation: Lutsenko SV, Cheremnykh EG, Sedyakina NE, Moldogazieva NT, Gromovykh TI, Feldman NB. Study of the biological activity of liposomal sanguinarine on cultures of tumor cells and protozoa. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2018;44:99-117. doi: [10.17223/19988591/44/6](https://doi.org/10.17223/19988591/44/6) In Russian, English Summary

Sergey V. Lutsenko¹, Elena G. Cheremnykh², Natalia E. Sedyakina¹,
Nurbubu T. Moldogazieva¹, Tatyana I. Gromovych¹, Nataliya B. Feldman¹

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

²Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

Study of the biological activity of liposomal sanguinarine on cultures of tumor cells and protozoa

Sanguinarine is a benzophenanthridine alkaloid with antimicrobial, antiviral, antiparasitic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiangiogenic, and antitumor activity. One of the important properties of sanguinarine is a pronounced ability to suppress thrombogenesis, tumor growth and metastasis. However, the low solubility of sanguinarine in biological fluids limits its medical use. The present research was devoted to the development of the liposomal form of sanguinarine and the study of its biological activity.

We obtained liposomes with sanguinarine on the basis of lecithin and cholesterol by the method of hydration of a thin film with buffer, followed by sonication and extrusion through a polycarbonate membrane with a pore size of 100 nm. Purification of liposomal dispersion from a drug that was not included in the vesicles was performed by gel filtration chromatography. We studied the morphology of the obtained liposomal particles by scanning electron microscopy; particle size and zeta potential were determined by dynamic light scattering. The study of the dynamics of sanguinarine release was conducted using the method of dialysis; quantitative analysis of the released sanguinarine from liposomes was performed using reverse-phase HPLC. The cytotoxic activity (CTA) of liposomal preparation against tumor cells of human breast carcinoma MCF-7 line was determined by the MTT assay. The toxicity and biological effects of liposomal sanguinarine on the cultures of *Paramecium caudatum* Ehrenberg and *Tetrahymena pyriformis* WH1, as well as the study of the effect of the drug on the complement system, were evaluated using the automated video registration system "BioLaT" (Russia).

According to electron microscopy data, the obtained liposomes were spherical nanosized particles (See Fig. 1). The mean size of the obtained liposomal particles with sanguinarine included in their composition, determined using the method of the dynamic light scattering, was 108.5 ± 2.2 nm, and the zeta potential was -34.7 ± 1.4 mV. The effectiveness of sanguinarine inclusion in liposomes was quite high and amounted to $72.8 \pm 4.8\%$. The study of the dynamics of sanguinarine release from liposomes in conditions close to physiological (pH 7.4; 37°C) showed that this process occurs at the highest rate in the first 2 h of incubation. Then, the process is prolonged (release of about 50% sanguinarine after 6 h of incubation, and about 93% after 70 h) (See Fig. 2). Liposomal sanguinarine showed dose-dependent cytotoxic activity against tumor cells of human carcinoma MCF-7 in the micromolar concentration range (See Fig. 3). The CTA of liposomal sanguinarine (IC_{50} 14.5 μ M) was slightly lower than the activity of free sanguinarine (IC_{50} 9.4 μ M), which can be explained by the prolonged release of sanguinarine from liposomes into the cell medium, as well as by the specificity of compartmentalization and intracellular release of the drug when it is absorbed by tumor cells by endocytosis. The prolonged release and the property of preferential accumulation of liposomes in tumor tissue can have a positive effect on therapeutic efficacy in the application of liposomal sanguinarine *in vivo*. The effect of liposomal sanguinarine on the survival of *P. caudatum* ciliates was dose-dependent (See Fig. 4). The minimum inhibitory concentration of liposomal sanguinarine was 0.49 μ M. At

concentrations from 0.245 μM and below, the drug did not cause cell death for 2 h; over the next 24 h, the death of the ciliates was neither observed. Thus, liposomal sanguinarine has a pronounced cytotoxic effect on *P. caudatum*, a representative of the protozoa, which can serve as the basis for the development of antiprotozoal drugs. To identify pathogenic *Protozoa* species spectrum vulnerable to the action of liposomal sanguinarine, additional research is required. We also assessed the influence of liposomal sanguinarine on the protective blood systems - coagulation and the complement system. The effect of liposomal sanguinarine on thrombus formation *in vitro* was evaluated in citrate plasma after its recalcification according to the time of the onset of thrombus formation and the resulting clot density (See Fig. 5). The clot size in plasma solutions with the addition of the drug was significantly smaller compared with the control. At the same time, liposomal sanguinarine induces the formation of a clot after 7 min of incubation, whereas in the control the formation of a clot begins only after 14 min of incubation. Thus, under the conditions of this experiment, liposomal sanguinarine had a pronounced stimulating effect on thrombus formation. Stimulation of thrombosis by liposomal sanguinarine can be caused both by direct activation of coagulation enzymes and by the induction of enzymatic reactions of the coagulation system, which can efficiently proceed on the surface of liposomal nanoparticles. The study of the effect of liposomal sanguinarine in a non-toxic concentration of 60 ng/ml on the functional activity of the complement system against *T. pyriformis* ciliates showed that the half-life of the ciliates as a target of the complement system in the medium containing serum and liposomal sanguinarine (T_{50} 21.7 min) reduced approximately twice compared with the control (T_{50} 41.6 min) (See Fig. 6). In the absence of serum in the samples, liposomal sanguinarine at a concentration of 60 ng/ml, on the contrary, had a stimulating effect on *T. pyriformis* growth - the value of the proliferation coefficient for native cells was 2.1 ± 0.2 , and for the treated cells it was 6.4 ± 0.8 . The obtained data may indicate the activating effect of liposomal sanguinarine with respect to the assembly of the membrane attack complex of the complement system on the surface of *T. pyriformis* cells, causing their death. This effect allows to envisage the prospect of using liposomal sanguinarine as an immunostimulating agent. Thus, the pronounced cytotoxic antitumor and antiprotozoal activity, demonstrated in experiments *in vitro*, makes it possible to consider liposomal sanguinarine as a promising antitumor and antiprotozoal agent. The detected effect of thrombosis stimulation by liposomal sanguinarine seems to be important when selecting the dose of the drug introduced into the bloodstream.

The paper contains 6 Figures and 32 References.

Key words: sanguinarine, liposomes, MCF-7 carcinoma, thrombus formation, antitumor activity, antiprotozoal activity, *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena pyriformis*.

Funding: This work was partially supported by the “Russian Academic Excellence Project 5-100”.

References

1. Kosina P, Walterová D, Ulrichová J, Lichnovský V, Stiborová M, Rýdlová H, Vicar J, Krecman V, Brabec MJ, Simánek V. Sanguinarine and chelerythrine: Assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food Chem. Toxicol.* 2004;42:85-91. doi: [10.1016/j.fct.2003.08.007](https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.007)
2. Zdarilova A, Vrublova E, Vostalova J, Klejdus B, Stejskal D, Proskova J, Kosina P, Svobodova A, Vecera R, Hrbac J, Cernochova D, Vicar J, Ulrichova J, Simanek V. Natural

- feed additive of *Macleaya cordata*: Safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46:3721-3726. doi: [10.1016/j.fct.2008.09.054](https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.054)
3. Miao F, Yang XJ, Zhou L, Hu HJ, Zheng F, Ding XD, Sun DM, Zhou CD, Sun W. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity. *Nat. Prod. Res.* 2011;25:863-875. doi: [10.1080/14786419.2010.482055](https://doi.org/10.1080/14786419.2010.482055)
 4. Yang XJ, Miao F, Yao Y, Cao FJ, Yang R, Ma YN, Qin BF, Zhou L. *In vitro* antifungal activity of sanguinarine and chelerythrine derivatives against phytopathogenic fungi. *Molecules* 2012;17:13026-13035. doi: [10.3390/molecules171113026](https://doi.org/10.3390/molecules171113026)
 5. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD, Hughes SH. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* 1991;54:143-154. doi: [10.1021/np50073a012](https://doi.org/10.1021/np50073a012)
 6. Miao F, Yang XJ, Ma YN, Zheng F, Song XP, Zhou L. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their *in vitro* acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2012;60:1508-1513. doi: [10.1248/cpb.c12-00618](https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00618)
 7. Yao J-Y, Li X-L, Shen J-Y, Pan X-Y, Hao G-J, Xu Y, Ying W-L, Ru H-S, Liu X-L. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* L. with activity against *Trichodina* sp. *Aquaculture*. 2011;318:235-238. doi: [10.1016/j.aquaculture.2011.04.035](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.035)
 8. Wang GX, Zhou Z, Jiang DX, Han J, Wang JF, Zhao LW, Li J. *In vivo* anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Vet. Parasitol.* 2010;171:305-313. doi: [10.1016/j.vetpar.2010.03.032](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.032)
 9. Lenfeld J, Kroutil M, Marsálek E, Slavík J, Preininger V, Simánek V. Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Med.* 1981;43:161-165. doi: [10.1055/s-2007-971493](https://doi.org/10.1055/s-2007-971493)
 10. Tsai IL, Wun MF, Teng CM, Ishikawa T, Chen IS. Anti-platelet aggregation constituents from Formosan *Toddalia asiatica*. *Phytochemistry*. 1998;48:1377-1382. doi: [10.1016/S0031-9422\(97\)00678-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00678-X)
 11. Xu JY, Meng QH, Chong Y, Jiao Y, Zhao L, Rosen EM, Fan S. Sanguinarine is a novel VEGF inhibitor involved in the suppression of angiogenesis and cell migration. *Mol. Clin. Oncol.* 2013;1(2):331-336. doi: [10.3892/mco.2012.41](https://doi.org/10.3892/mco.2012.41)
 12. Gaziano R, Moroni G, Buè C, Miele MT, Sinibaldi-Vallebona P, Pica F. Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine: Evidence and perspectives. *World J. Gastrointest Oncol.* 2016;8:30-39. doi: [10.4251/wjgo.v8.i1.30](https://doi.org/10.4251/wjgo.v8.i1.30)
 13. Maseri A, Cianflone D. Inflammation in acute coronary syndromes. *Eur. Heart J. Supplements*. 2002;4(Suppl. B):B8-B13. doi: [10.1016/S1520-765X\(02\)90009-X](https://doi.org/10.1016/S1520-765X(02)90009-X)
 14. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2009;373:1849-1860. doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)60503-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60503-1)
 15. Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.* 2005;353:2373-2383. doi: [10.1056/NEJMra052717](https://doi.org/10.1056/NEJMra052717)
 16. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 2004;56:387-437. doi: [10.1124/pr.56.3.3](https://doi.org/10.1124/pr.56.3.3)
 17. Jeng JH, Wu HL, Lin BR, Lan WH, Chang HH, Ho YS, Lee PH, Wang YJ, Wang JS, Chen YJ, Chang MC. Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production. *Atherosclerosis*. 2007;191:250-258. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.023](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.023)
 18. Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares WL, Cassali GD. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: Correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet. Pathol.* 2009;46:1275-1280. doi: [10.1354/vp.08-VP-0226-C-FL](https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0226-C-FL)

19. Han MH, Yoo YH, Choi YH. Sanguinarine-induced apoptosis in human leukemia U937 cells via Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Chemotherapy*. 2008;54:157-165. doi: [10.1159/000140359](https://doi.org/10.1159/000140359)
20. Adhami VM, Aziz MH, Reagan-Shaw SR, Nihal M, Mukhtar H, Ahmad N. Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. *Mol Cancer Ther*. 2004;3:933-940.
21. Park SY, Jin ML, Kim YH, Lee SJ, Park G. Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression. *Oncol. Rep*. 2014;31:497-504. doi: [10.3892/or.2013.2843](https://doi.org/10.3892/or.2013.2843)
22. Zhang X, Lu S, Han J, Sun S, Wang L, Li Y. Preparation, characterization and *in vivo* distribution of solid lipid nanoparticles loaded with syringopicroside. *Pharmazie*. 2011;66:404-407. doi: [10.1691/ph.2011.0350](https://doi.org/10.1691/ph.2011.0350)
23. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual [Internet]*. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (access 12.09.2018)
24. Cheremnykh EG, Kuleshin AV, Kuleshina ON. Screening of foods additives on infusoria. *Vestnik Rossiyskogo universitetata druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti = RUDN Journal of Ecology and Life Safety*. 2011;3:5-12. In Russian
25. Kuleshina ON, Kozlov LV, Cheremnykh EG. A universal method for measuring functional activity of complement in humans, laboratory, domestic, and agricultural animals, amphibians, and birds. *Bul. Exp. Biol. Med*. 2014;157(2):285-287. doi: [10.1007/s10517-014-2546-5](https://doi.org/10.1007/s10517-014-2546-5)
26. Ivanov PA, Faktor MI, Karpova NS, Cheremnykh EG, Brusov OS. Complement-mediated death of ciliate *Tetrahymena pyriformis* caused by human blood serum. *Bul. Exp. Biol. Med*. 2016;160(6):775-778. doi: [10.1007/s10517-016-3307-4](https://doi.org/10.1007/s10517-016-3307-4)
27. Riddick TM, Zeta-Meter, Inc. Control of colloid stability through zeta potential: With a closing chapter on its relationship to cardiovascular disease. Livingston Pub. Co.; 1968. 372 p.
28. Feldman NB, Kuryakov VN, Sedyakina NE, Gromovykh TI, Lutsenko SV. Preparation of liposomes containing benzophenanthridine alkaloid sanguinarine and evaluation of its cytotoxic activity. *Int. J. Nanotechnol*. 2018;15(4/5):280-287. doi: [10.1504/IJNT.2018.094785](https://doi.org/10.1504/IJNT.2018.094785)
29. Lutsenko SV, Gromovykh TI, Kashirin VV, Kuryakov VN, Baranova AA, Sadykova VS, Feldman NB. *In vitro* study of antitumor and antimicrobial activity of a preparation of pegylated liposomes with sanguinarine. *Antibiotiki i Khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2018;3-4:3-7. In Russian
30. Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003;361(9362):1025-1034. doi: [10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)
31. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 2004;27(5):305-318. doi: [10.1016/j.cimid.2004.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004)
32. Nimir AR, Saliem A, Ibrahim IA. Ophthalmic parasitosis: a review article. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis*. 2012;2012:587402. doi: [10.1155/2012/587402](https://doi.org/10.1155/2012/587402)

Received 24 September 2018; Revised 21 November 2018;
Accepted 05 December 2018; Published 27 December 2018

Author info:

Lutsenko Sergey V, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8-2 Trubetskaya Str., Moscow 119991, Russian Federation.

E-mail: svlutsenko57@mail.ru

Cheremnykh Elena G, Cand. Sci. (Tech.), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Biochemistry, Mental Health Research Center, 34 Kashirskoye shosse, Moscow 115522, Russian Federation.

E-mail: elcher10@yandex.ru

Sedyakina Natalia E, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Professor, Department of Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8-2 Trubetskaya Str., Moscow 119991, Russian Federation.

E-mail: nsedyakina@mail.ru

Moldogazieva Nurbubu T, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8-2 Trubetskaya Str., Moscow 119991, Russian Federation.

E-mail: nmoldogazieva@mail.ru

Gromovykh Tatyana I, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8-2 Trubetskaya Str., Moscow 119991, Russian Federation.

E-mail: gromovykhtatyana@mail.ru

Feldman Nataliya B, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8-2 Trubetskaya Str., Moscow 119991, Russian Federation.

E-mail: n_feldman@mail.ru