

На правах рукописи

Куделькина Вера Владимировна

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА И
ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА В СОСТАВЕ PLGA-
НАНОЧАСТИЦ НА МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ**

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2023

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Макарова Ольга Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, заведующий патологоанатомическим отделением, врач-патологоанатом Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рыжова Марина Владимировна

доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточной биологии отдела патоморфологии клеточной биологии и биохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Ерохина Мария Владиславовна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (450008, Приволжский федеральный округ, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3)

Защита диссертации состоится 28 сентября 2023 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета (24.1.204.02) Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» и на сайте www.med.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

По классификации ВОЗ, принятой в 2021 году, глиобластома человека (ГБ) относится к диффузным глиомам взрослых IDH (Isocitrate DeHydrogenase)-дикого типа, 4 степени злокачественности, имеет агрессивное течение и крайне неблагоприятный прогноз (Яковленко Ю.Г., 2019). ГБ IDH-дикого типа встречается примерно в 90% всех случаев диффузных глиом высокой степени злокачественности (Mallick S. et al., 2021). Медиана выживаемости больных ГБ после рекомендованной стандартом терапии NCCN (National Comprehensive Cancer Network 2.2022), включающей хирургическое удаление, лучевую терапию и химиотерапию темозоломидом, а также лечение переменным электрическим полем, составляет около 21 месяца. Двухлетняя выживаемость наблюдается у 30% больных (Зрелов А.А. с соавт., 2018), а пятилетняя не превышает 5,8% (Рябова А.И. с соавт., 2018). В связи с недостаточной эффективностью терапии больных ГБ необходим поиск новых подходов к ее лечению.

Известно, что при системной химиотерапии злокачественных глиом проникновению лекарственных веществ в опухоль препятствует гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), а также повышенное давление тканевой жидкости в опухолевых тканях и перитуморальной зоне (Chiarelli P.A. et al., 2015). Известно, что плотные межклеточные контакты эндотелия кровеносных сосудов головного мозга предотвращают транспорт молекул диаметром больше 12 нм (Agarwal S. et al., 2011; Kadry H. et al., 2020). В опухолях с высокой васкуляризацией, к которым относится ГБ, рост кровеносных сосудов быстрый, стенки сосудов не сформированы, в связи с чем микро- и наномолекулы, имеющие диаметр до 150-200 нм, могут проникать из кровеносных сосудов в межклеточное вещество и клетки опухоли – эффект EPR (the Enhanced Permeability and Retention) повышенной проницаемости и удержания (Maeda H., 2012).

Для повышения эффективности химиотерапии опухолей и снижения ее токсического действия применяют микро- и наноносители различной природы, такие как липосомы, полимерные сферы, трубки и кубы, скаффолды и др. В настоящее время для доставки противоопухолевых лекарственных веществ широко используют сферические наночастицы (НЧ) из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA-НЧ), средний размер которых составляет 100-120 нм. В организме в результате гидролиза PLGA-НЧ деградируют до естественных метаболитов – углекислого газа и воды. Полимер PLGA одобрен FDA (Food and Drug Administration) для применения в клинической практике (Сурья Н. с соавт., 2021).

В настоящее время для лечения пациентов с ГБ используют лекарственное вещество первой линии – алкилирующий цитостатик темозоломид, и при определенных в стандарте терапии условиях противоопухолевые вещества: ломустин, прокарбозин, цисплатин, карбоплатин, этопозид, кармустин, прокарбозин, винкристин. В тоже время для терапии пациентов со злокачественными опухолями – лимфобластным лейкозом, саркомой мягких тканей, опухолями молочной и щитовидной железы, мочевого пузыря, желудка, яичников, нейробластомы и других применяют противоопухолевый антибиотик доксорубицин (Докс), оказывающий относительно высокое системное токсическое действие. При стандартной терапии ГБ Докс не применяется (Takemura G. et al., 2007), так как считают, что он не проникает в ткани головного мозга через ГЭБ при системном введении (Yamagishi T. et al., 2013).

Однако показана противоопухолевая активность Докс в отношении ГБ *in vitro* (Matcovschii V. et al., 2019) и при локальном введении в опухоль *in vivo* (Lesniak M.S. et al., 2005; Matcovschii V. et al., 2019).

При выборе лекарственного вещества для химиотерапии больных с ГБ важна не только его высокая противоопухолевая активность, но и низкие токсические эффекты (Abraham D., 2010; Vodor N. et al., 2012). Известно, что при системном введении противоопухолевых лекарственных веществ в составе НЧ их токсичность снижается. Заведующей лабораторией систем доставки лекарственных веществ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», д.х.н., профессором С.Э. Гельпериной (Gelperina S. et al., 2010) была получена наносомальная лекарственная форма Докс на основе PLGA-НЧ (Докс-PLGA), терапевтические эффекты и токсическое действие которой не изучены.

Следует отметить, что в доклинических исследованиях «Золотым стандартом» оценки противоопухолевого и токсического побочного действия лекарственных препаратов (ЛП) остается морфологическое исследование, которое в сочетании с морфометрическими, биохимическими, иммуногистохимическими и молекулярно-генетическими методами позволяет осуществить выбор наиболее эффективных и безопасных форм лекарственных веществ (Абросимов А.Ю. с соавт., 2021).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Развитие фармакологической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (государственный контракт №13411.1008799.13.144).

Степень разработанности темы исследования.

Несмотря на повышение краткосрочной выживаемости больных с ГБ, проблема долгосрочной выживаемости пациентов до сих пор не решена (Ahmed R. et al., 2014; Рябова А.И. с соавт., 2018). Сложной задачей остается преодоление исходной и приобретенной резистентности опухоли к проводимой терапии: ГБ почти в 100% случаев рецидивирует (Nabors L.V. et al., 2018; Padovan M. et al., 2022). Даже если детектируемые уровни лекарственных веществ достигают ЦНС, их концентрации оказываются недостаточными для гибели опухолевых клеток, кроме того, многие из них быстро выводятся из тканей опухоли (Tosoni A. et al., 2008; Banks W.A. et al., 2021). Ранее были разработаны способы доставки лекарственных веществ через ГЭБ для лечения заболеваний ЦНС, в том числе опухолей мозга, с помощью НЧ, покрытых липопротеинами низкой плотности (Meng Liang et al., 2018) полимерных НЧ (Sabel B. et al., 2000; Кройтер Й., с соавт. 2009). Эти способы повышают биодоступность гидрофобных лекарственных веществ, способствуют их избирательному накоплению в тканях опухоли, снижают системную токсичность. Разработаны липосомальные пэгилированные формы противоопухолевого антрациклина Докс – (Doxil™) и (Caelyx™), которые снижают его системную токсичность, но не уменьшают противоопухолевую эффективность (Park J.W., 2002; Robert N.J. et al., 2004; Dellapasqua S. et al., 2021). Тем не менее, данные препараты при системном введении оказались недостаточно эффективными в доклинических и ранних клинических исследованиях у пациентов с опухолями ЦНС.

Для оценки эффективности противоопухолевых препаратов необходимы релевантные экспериментальные модели опухолей. Наиболее адекватная модель ГБ человека – ГБ 101.8 крысы. Она была получена Л.Я. Яблоновской (1967), по морфологической картине эта опухоль сходна с диффузной глиомой 4 степени

злокачественности человека (Авцын А.П. с соавт. 1988; Халанский А.С. с соавт., 2013). Глиобластома 101.8 воспроизводится у 98-100% животных (Steiniger S.C. et al., 2004; Ambrosi A.S. et al., 2006; Hekmatara T. et al., 2009; Гельперина С. Э. с соавт., 2010; Wohlfart S. et al., 2011; Maksimenko O. et al., 2019).

Важной задачей доклинического исследования противоопухолевых веществ является определение их побочных токсических эффектов. «Пустые» (плацебо) поли(бутил)цианоакрилатные и PLGA-НЧ не вызывают острого и субхронического токсического действия (Гельперина С.Э. с соавт., 2010; Lotfipour F. et al., 2021). В эксперименте показано, что после курсового введения токсической дозы Докс его кардиотоксическое действие наиболее ярко проявляется в поздние сроки наблюдения (Zucchi R. et al., 2003). По данным патоморфологического исследования в миокарде выявлен миоцитоллиз кардиомиоцитов, утрата их поперечной исчерченности, лимфоидно-макрофагальная инфильтрация (Zucchi R. et al., 2003). По клиническим данным у пациентов при химиотерапии Докс развивается токсический миокардит (Rawat P. S. et al., 2021). В исследовании Н.П. Макаровой с соавт. (2005) при моделировании субхронической токсичности максимальные токсические эффекты Докс и Докс-НЧ выявлены в сердце и семенниках, причем токсическая активность наносомальной формы Докс с поверхностно-активным веществом (ПАВ) – Твин 1% была наименьшей. При моделировании нефротоксичности, вызванной токсическими дозами Докс (20 мг/кг) у грызунов, показано, что он вызывает повреждение почечных клубочков и канальцев почек (Grant M.K.O. et al., 2019). При применении липосомальной формы Докс (токсическая доза 5 мг/кг, в/в) по сравнению с его стандартной формой показано снижение показателей летальности у крыс, что связано с его меньшей токсичностью (Инчина В.И. с соавт., 2020). Морфологические изменения миокарда, печени и почек при введении терапевтических доз Докс-PLGA не изучены.

Таким образом, морфологическая и иммуногистохимическая оценка противоопухолевого эффекта и токсического действия терапевтических доз PLGA-НЧ с противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда – Докс на экспериментальной модели ГБ у крыс является актуальной задачей, и ее решение позволит объективно оценить перспективность применения этой лекарственной формы для лечения злокачественных опухолей головного мозга у человека.

Цель исследования. Провести морфологическую, иммуногистохимическую и биохимическую оценку противоопухолевого эффекта и токсического действия терапевтических доз доксорубина в составе наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот на модели глиобластомы.

Задачи исследования:

1. Оценить продолжительность жизни и выживаемость крыс с глиобластомой 101.8 при развитии опухоли без введения и при введении терапевтических доз доксорубина и доксорубина в составе наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот.

2. Провести волюмометрическую оценку размеров глиобластомы 101.8 у крыс сравниваемых групп.

3. Охарактеризовать клеточные и тканевые изменения глиобластомы 101.8 по показателям гибели, митотической активности, числа Ki67-положительных опухолевых клеток, количества кровеносных сосудов и GFAP-позитивных структур нейроглии, содержания VEGF A в сыворотке крови у крыс сравниваемых групп.

4. Провести морфологическую, биохимическую оценку кардио- и гепатотоксического действия терапевтических доз доксорубицина и доксорубицина в составе наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот.

5. Изучить нефротоксические эффекты терапевтических доз доксорубицина и доксорубицина в составе наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот на гистологическом и ультраструктурном уровнях.

Объект и предмет исследования – экспериментальная глиобластома 101.8 крысы, почки, сердце, печень и их морфологическое и иммуногистохимическое исследование при введении терапевтических доз доксорубицина и его PLGA-наноформы.

Теоретической и методологической базой диссертации являются научные работы отечественных и зарубежных авторов в области изучения терапии глиобластомы, оценки терапевтической эффективности и токсического действия, химиотерапевтических препаратов; изучения патоморфоза опухолей при химиотерапии; сравнение эффективности и токсичности лекарственных веществ в составе наночастиц и их стандартных форм.

Информационной базой исследования являются научные статьи в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций, международные классификации опухолей ЦНС и стандарты лечения опухолей мозга.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. – Клеточная биология, согласно пунктам 1, 13.

Научная новизна.

На модели глиобластомы 101.8 крысы впервые установлен противоопухолевый эффект терапевтических доз как доксорубицина, так и доксорубицина в составе PLGA-наночастиц. При глиобластоме 101.8 противоопухолевый эффект доксорубицина обусловлен увеличением числа гибнущих опухолевых клеток и снижением количества кровеносных сосудов окрашенных изолектином В4, а доксорубицина в составе PLGA наночастиц – снижением пролиферирующих Ki67-положительных клеток.

По сравнению с доксорубицином терапевтические дозы доксорубицина в составе PLGA-наночастиц характеризуются более эффективным противоопухолевым действием, что подтверждается увеличением средней продолжительности жизни и выживаемости животных, а также торможением роста опухоли.

По данным морфологического, ультраструктурного и биохимического исследований, показано, что курсовое введение терапевтических доз доксорубицина в составе PLGA-наночастиц по сравнению с доксорубицином оказывает менее выраженное токсическое действие на миокард и почки.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

В эксперименте у животных с глиобластомой 101.8 установлен противоопухолевый эффект терапевтических доз доксорубицина и его PLGA наноформы. При введении животным с глиобластомой 101.8 доксорубицина увеличивается число гибнущих опухолевых клеток и снижается количество кровеносных сосудов, окрашенных изолектином В4, а доксорубицина в составе PLGA-наночастиц – снижается количество пролиферирующих Ki67-положительных клеток опухоли. Терапевтические дозы доксорубицина в составе PLGA-наночастиц по сравнению с доксорубицином характеризуются более эффективным противоопухолевым действием, что отражается в увеличении средней продолжительности жизни и выживаемости животных, а также торможением роста опухоли. При введении обоих лекарственных препаратов GFAP-позитивные структуры

нейроглии определяются только на периферии опухолей, а у животных без введения доксорубина и доксорубина в составе PLGA-наночастиц они располагаются перитуморально с распространением к центру опухоли.

Кардио- и нефротоксическое действие курсового введения терапевтических доз доксорубина в составе PLGA-наночастиц по сравнению с доксорубином по результатам морфологического, ультраструктурного, и биохимического исследования менее выражено. Гепатотоксические эффекты обоих лекарственных препаратов слабо выражены и не различаются по степени тяжести.

Полученные в исследовании данные о морфологической и иммуногистохимической характеристике противоопухолевого эффекта и токсического действия терапевтических доз доксорубина и его PLGA-наночастицы на модели глиобластомы следует учитывать при разработке новых подходов к лечению глиобластомы у человека.

Методология и методы исследования.

Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. В работе использованы следующие методы: экспериментальной онкологии, биохимические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические, иммуноферментный анализ, электронной микроскопии и статистические.

Положения, выносимые на защиту:

1. При экспериментальной глиобластоме 101.8 курсовое введение терапевтических доз доксорубина и доксорубина в составе PLGA-наночастиц оказывает противоопухолевый эффект, характеризующийся торможением роста опухоли и снижением интенсивности обновления ее клеток.

2. Доксорубин в составе PLGA-наночастиц по сравнению с доксорубином оказывает более выраженное противоопухолевое действие по показателям продолжительности жизни и выживаемости животных, торможения роста опухоли. При введении животным с глиобластомой терапевтических доз Докс-PLGA объемы опухолей были меньше за счет преобладания небольших и микроопухолей. Более высокая противоопухолевая эффективность Докс-PLGA обусловлена снижением пролиферативной активности клеток опухоли.

3. По данным морфологического, биохимического и электронно-микроскопического исследования терапевтические дозы доксорубина в составе PLGA-наночастиц по сравнению с доксорубином характеризуются менее выраженным кардио- и нефротоксическим действием.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследования обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом полученных данных, воспроизводимостью результатов, использованием современных адекватных методов исследования, корректным применением статистических методов, критическим анализом результатов исследования в сопоставлении с актуальными литературными данными.

Материалы диссертации доложены на: European Nanomedicine Meeting (France, 2015); II International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma (Spain, 2015); Научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016; 2018); 10-th World meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (UK, 2016); V съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017); VI International Symposium. Control release society annual meeting and exposition (USA, 2017); Всероссийской научной

конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына) (Москва, 2021); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной онкологии» (Ростов-на-Дону, 2022).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 18 научных работ, из них 6 в журналах, входящих в перечень ВАК РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

Внедрение результатов работы. Материалы диссертационного исследования используются в лекционном курсе на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского института РУДН.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 224 страницах машинописного текста и состоит из глав – введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, а также списка литературы, включающего 575 источников, из них 79 российских и 496 зарубежных. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 43 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 94 половозрелых самцах крыс Вистар массой тела 180-220 г (питомник «Столбовая», Россия). Эксперимент проводили с соблюдением прав и принципов, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). При работе с животными и проведении исследования руководствовались «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003), а также «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2012). Исследование было одобрено биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (Протокол № 9.01.13 от 16.09.2013 года).

Глиобластому 101.8 моделировали на крысах Вистар путем интракраниальной трансплантации фрагментов опухолевой ткани, полученной от животных-доноров.

Исследуемые фармакологические препараты: Доксорубицина гидрохлорид (Докс), лиофилизат для внутривенного введения (Sicor SpA, Italy, серия 7000A00 0313) и Доксорубицина гидрохлорид в НЧ из сополимера молочной и гликолевой кислот (Докс-PLGA), лиофилизат для внутривенного введения (ООО «Технология лекарств», Россия). Соплимер молочной и гликолевой кислот 50:50 (PLGA, Evonik Röhm GmbH, Германия). Средний размер частиц после ресуспендирования составил $110,0 \pm 0,9$ нм. Соотношение PLGA:Докс в лиофилизате было 10:1, около 80% Докс связано с полимером.

Животные с ГБ 101.8 без введения и после введения терапевтических доз Докс и Докс-PLGA были разделены на группы: для оценки продолжительности жизни и выживаемости (n=34), определения размеров опухолей, оценки в ней морфологических изменений и токсического действия на печень и сердце (n=27). Нефротоксичность Докс и Докс-PLGA исследовали у интактных животных (n=25).

Во всех экспериментах в качестве растворителя Докс и Докс-PLGA использована вода для инъекций, а при оценке нефротоксического эффекта 1% водный раствор плуроника P188, который является ПАВ и влияет на механические свойства клеточных мембран и их микровязкость (Batrakova E.V., et al., 2008). Препараты Докс и Докс-PLGA для оценки их эффективности, лекарственного патоморфоза и изучения кардио- и гепатотоксичности при ГБ 101.8, вводили в терапевтической дозе 1,5 мг/кг внутривенно на 2, 5 и 8-е сутки после трансплантации опухоли. Для сравнительной оценки нефротоксичности исследуемых препаратов – Докс и Докс-PLGA вводили животным на 1, 3 и 5-е сутки в терапевтической дозе 1,75 мг/кг. Животных выводили из эксперимента передозировкой препарата Золетил (внутривенно 25 мг/кг).

Методы экспериментальной онкологии. Перевиваемую глиобластому 101.8 крыс ревитализировали и трансплантировали интракраниально. Проводили химиотерапию Докс и Докс-PLGA крыс с глиобластомой 101.8. Продолжительность жизни и выживаемость животных с глиобластомой 101.8 определяли в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012).

Гистологический метод. У экспериментальных животных выделяли головной мозг, печень, сердце и почки. Головной мозг и фрагмент почки фиксировали в 10 % нейтральном формалине, а сердце и печень в жидкости Буэна.

Гистохимический метод. На парафиновых срезах головного мозга крыс с опухолью проводили гистохимическую реакцию с изолектином В4 (VectorLab, США) для выявления кровеносных сосудов. На парафиновых срезах почки проводили ШИК-реакцию для выявления нейтральных гликопротеинов в щеточной каемке эпителия извитых канальцев.

Иммуногистохимический метод. На парафиновых срезах головного мозга животных с опухолью проводили иммуногистохимическую реакцию с антителами к Ki67 (Abcam, США), а также к глиальному фибриллярному кислом белку – GFAP (Dako, Дания) и системой детекции Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences inc., Япония); хромоген – DAB (Dako, Дания). Проводили подсчет Ki67-иммунопозитивных клеток в стандартном поле зрения и соотносили их число с общим количеством опухолевых клеток и среди них вычисляли процентную долю положительно окрашенных.

Морфометрический метод. Подсчитывали митозы, апоптотические тельца в опухоли на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, в 5-10 полях зрения на стандартной площади (65025 мкм, х400) гистологического среза. Для оценки кинетики опухолевого роста вычисляли коэффициент клеточного обновления – ККО (Лушников Е.Ф., 1976; Лушников Е.Ф., Абросимов А.И., 2001; Казанцева И.А., Гаганов Л.Е., 2014). $KKO = NM / NG$; где NM – число митозов в поле зрения на стандартной площади среза; NG – число клеток с признаками гибели в поле зрения на стандартной площади среза.

Волюмометрический метод. Для определения объема опухолей проводили их 3D-реконструкцию (Marcos R., 2012; Овчаренко В.В., 2015). Сканировали серийно-ступенчатые гистологические срезы головного мозга крыс (Epson perfection v700 photo, Япония), получали их цифровые копии – изображения. Контуры опухоли обводили, с помощью программы Image-Pro Premiere (Media Cybernetics, S/N 809-10000-1010, США) получали 3D изображения, рассчитывали объем и торможение роста опухоли – ТРО (Миронов А.Н., 2012).

Метод электронной микроскопии. Вырезали фрагменты ткани на границе коркового и мозгового вещества почки, фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде на фосфатном буфере (0,1М рН 7,3) промывали в 0,1М фосфатном буфере, фиксировали в 1% растворе OsO₄. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим.

Иммуноферментный анализ. Кровь забирали из шейных вен, отделяли сыворотку, которую хранили до исследования при -20⁰ С в течение 3 месяцев. В сыворотке крови животных методом ИФА определяли концентрации сосудистого фактора роста-А VEGF А – (Bender MedSystems GmbH, Австрия). Спектрофотометрию образцов проводили на микропланшетном ридере (Anthos 2010, Австрия) при длине волны 495 нм.

Биохимический метод. Оценивали активность ферментов: аспаратаминотрансферазы – АСТ, аланинаминотрансферазы – АЛТ, кратинфосфокиназы – КФК общей и сердечной изоформы в сыворотке крови экспериментальных животных на биохимическом анализаторе Mindray Bs-120 (Китай) с использованием наборов Human GmbH (Германия).

Статистические методы. Статистическая обработка результатов была проведена с использованием программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., США). Полученные данные экспериментов, при оценке методом Колмогорова-Смирнова соответствовали ненормальному распределению, поэтому использовали непараметрическую статистику. Оценку выживаемости проводили непараметрическим методом Каплана-Мейера (Kaplan E.L., Meier P., 1958). Для характеристики центральных тенденций объемов опухолей использовали медиану Me (Q1-25%; Q3-75%). Для сравнения экспериментальных групп были применены методы Краскела-Уоллиса и Коновера. Статистически значимо различающимися считали результаты, для которых значение составляло $\leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ДОЗ ДОКС И ДОКС-PLGA

1. Оценка продолжительности жизни и выживаемости животных с глиобластомой 101.8 при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA. Клинические признаки интракраниального роста ГБ 101.8 характеризовались изменениями шерстного покрова, снижением двигательной активности, парезами и параличами конечностей, приапизмом. Гибель животных в результате роста опухоли в группе без введения ЛП наступала на 14-21-е сутки. У крыс всех групп наблюдения оценивали медиану, среднюю продолжительность жизни (СПЖ), увеличение продолжительности жизни (УПЖ), Т/С и выживаемость. Исследование проводили после гибели и 100-дневного дожития животных. На кривых Каплана-Мейера представлены различия выживаемости животных сравниваемых групп (рис. 1).

По сравнению с животными без введения ЛП в группе крыс, которым вводили Докс-PLGA, увеличились показатели продолжительности жизни и выживаемости ($p=0,002$). В группе животных, которым вводили Докс-PLGA, выжило 22% крыс, тогда как при введении крысам Докс выживших животных не было (рис.1). При оценке противоопухолевой эффективности Докс-PLGA у крыс с ГБ 101.8 максимальное увеличение продолжительности жизни было у животных, при введении Докс-PLGA: 84% по сравнению с крысами без введения ЛП и 59% при введении Докс. Средняя продолжительность жизни животных при введении Докс-PLGA была максимальной.

Полуколичественный критерий оценки терапевтической активности – Т/С для Докс-PLGA на основании СПЖ составил 184 % (+++), а полная ремиссия, менее 50 % животных, (полная ремиссия – отсутствие признаков опухоли в течение 100 суток, что подтверждено результатами морфологического исследования), и соответствует выраженному противоопухолевому действию данной лекарственной формы (Миронов А.Н., 2012).

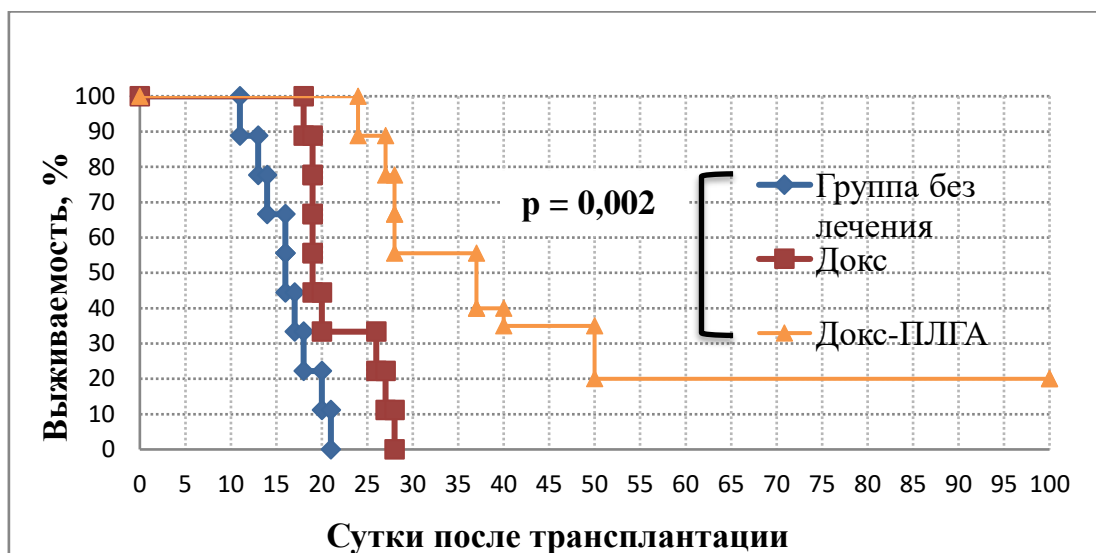


Рисунок 1. Кривые выживаемости Каплана-Мейера в течение 100 дней животных с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов (n=15) и при введении терапевтических доз Докс (n=10) и Докс-PLGA (n=9)

По сравнению с животными без введения ЛП в группе крыс, которым вводили Докс-PLGA, увеличились показатели продолжительности жизни и выживаемости ($p=0,002$). В группе животных, которым вводили Докс-PLGA, выжило 22% крыс, тогда как при введении крысам Докс выживших животных не было (рис.1). При оценке противоопухолевой эффективности Докс-PLGA у крыс с ГБ 101.8 максимальное увеличение продолжительности жизни было у животных, при введении Докс-PLGA: 84% по сравнению с крысами без введения ЛП и 59% при введении Докс. Средняя продолжительность жизни животных при введении Докс-PLGA была максимальной. Полуколичественный критерий оценки терапевтической активности – Т/С для Докс-PLGA на основании СПЖ составил 184 % (+++), а полная ремиссия, менее 50 % животных, (полная ремиссия – отсутствие признаков опухоли в течение 100 суток, что подтверждено результатами морфологического исследования), что соответствует выраженному противоопухолевому действию данной лекарственной формы (Миронов А.Н., 2012). Тогда как Т/С Докс, составил только 130 % (\pm), что трактуется в соответствии с рекомендациями А.Н. Миронова (2012) как сомнительный противоопухолевый эффект. Таким образом, на основании результатов исследования выживаемости и средней продолжительности жизни крыс Вистар с интракраниальной ГБ 101.8 при введении терапевтических доз Докс-PLGA по сравнению с животными без введения ЛП и при введении Докс, показано, что оба исследованных препарата оказывают противоопухолевый эффект. При введении крысам с ГБ 101.8 Докс увеличивалась продолжительность жизни крыс (УПЖ) на 25% по сравнению с

животными без введения ЛП. Наибольший эффект по СПЖ и УПЖ выявлен при введении крысам Докс-PLGA.

2. Волюмометрическая оценка размеров глиобластомы 101.8 и их вариабельность у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA. Размер злокачественных опухолей является значимым независимым прогностическим фактором (Im W.J. et al., 2012; Bette S. et al., 2018; Abedi A.A., et al., 2021). В отличие от других исследователей, оценивавших противоопухолевые эффекты на модели ГБ по площади опухолей на гистологических срезах (Wohlfart S. et al., 2011; Johnson P.J. et al., 2022), для определения размеров опухолей мы использовали метод 3D реконструкции по серийно-ступенчатым фронтальным окрашенным срезам головного мозга, что позволило получить точные показатели объема опухолей и ТРО. Медиана объемов опухолей в группе крыс без введения ЛП была 95,8 (5,9; 114,6) мм³. У животных, при введении Докс, она составила 12,9 (9,2; 29,4) мм³, в группе Докс-PLGA - 2 (0; 1,9) мм³, а торможение роста опухоли (ТРО) и Т/С – 75,6 и 93,6 %; 13,5 и 2,1 соответственно (рис. 2).

Таким образом, по результатам волюмометрической оценки размеров ГБ 101.8 показано, что терапевтические дозы как Докс, так и Докс-PLGA тормозят рост опухолей, соответственно, в 7 и 47 раз по сравнению с животными без введения ЛП.

Объемы опухолей во всех экспериментальных группах животных варьировали в широком диапазоне, разброс их размеров составил от 0 до 120 мм³. В каждой группе были как микроопухоли, так и небольшие и большие новообразования (рис. 3).

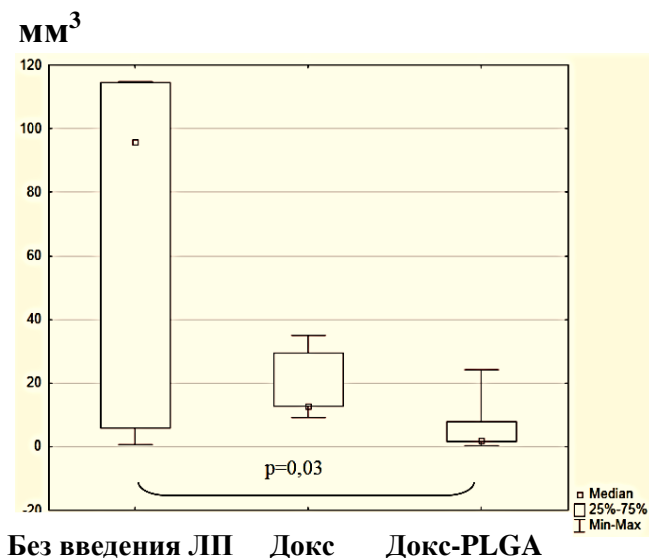


Рисунок 2. Объемы глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов (ЛП) и при введении Докс и Докс-PLGA

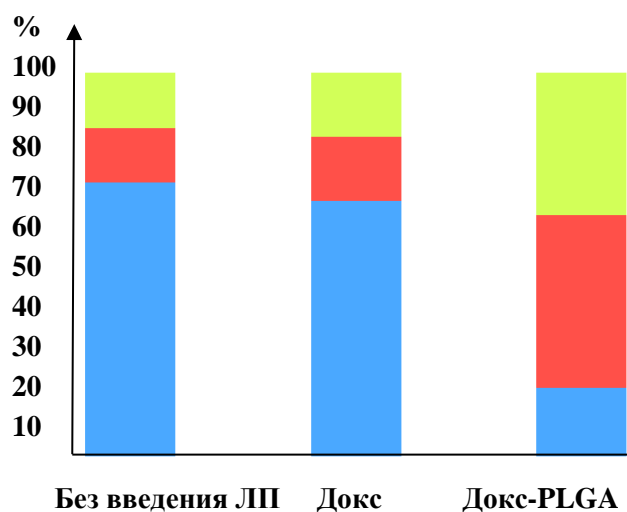


Рисунок 3. Вариабельность размеров глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов (ЛП) и при введении Докс и Докс-PLGA

- – микроопухоли (0 – 1 мм³),
- – небольшие опухоли (2 – 10 мм³),
- – большие опухоли (11 -120 мм³)

В группах животных без введения ЛП и при введении Докс опухоли были, главным образом, больших размеров, в то время как у животных, после введения Докс-PLGA, доля больших опухолей уменьшилась примерно на 30 % за счет увеличения доли небольших опухолей (рис. 3).

Таким образом, по данным волюмометрической оценки размеров опухолей оба исследованных препарата оказывали выраженное противоопухолевое действие. Размеры опухолей у животных при введении Докс и Докс-PLGA были меньше, чем в группе без введения ЛП. При введении животным Докс-PLGA размеры опухолей были наименьшими, преобладали небольшие и микроопухоли по сравнению с группой животных без введения лекарственных препаратов.

3. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA. При морфологическом исследовании ГБ 101.8 у крыс без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA опухоли характеризовались высокой клеточностью, выраженной атипией опухолевых клеток, ядра которых были гиперхромными, полиморфными по форме и размерам с крупными ядрышками. Среди опухолевых клеток было много митотически делящихся. Встречались патологические митозы: концентрические, полая метафаза, ассиметричные, колхициноподобные (рис. 4). Патологические формы митоза появляются в результате аномальной сборки митотического веретена деления клеток опухоли, что приводит к генетической нестабильности, устойчивости к терапии и прогрессии опухоли (Caracciolo V. et al., 2010). В опухолях у крыс, которым вводили терапевтические дозы Докс – у 2-х из 5-и животных и Докс-PLGA – у 2-х из 9-и животных, выявлялись многоядерные клетки «монстры» – от единичных в препарате и до 5-7 клеток в п/з. Многоядерные клетки были крупными, содержали несколько ядер. У 5-и из 5-и животных ГБ 101.8 при введении Докс и 8-и из 9-и при введении Докс-PLGA опухоль прорастала стенку бокового желудочка головного мозга и частично заполняла его просвет. Отмечался инфильтративный периваскулярный и перинейрональный рост опухоли в окружающие ткани головного мозга. Во всех опухолях выявлялось большое количество кровеносных сосудов, они были неправильной, округлой или овальной формы с тонкой стенкой, представленной эндотелием и небольшим количеством тонких волокон, а также щелевидной формы с частично сформированной стенкой из эндотелия и хорошо визуализируемых волокон. Показано, что в ГБ перicyты расположены только на 10-20% площади наружной стенки сосудов опухоли, что является структурной основой для проницаемости сосудов и возникновению кровоизлияний (Segura-Collar B. et al., 2021). Кроме того, сосуды образовывали «сосудистые розетки» из 3-5 близко расположенных сосудов. Обнаружены гломерулоподобные пролифераты эндотелия, что также описано при ГБ у человека (Scherer H.J., 1938). В опухолях часто выявлялись мелкие и обширные кровоизлияния, от единичных до множественных. Во многих опухолях, особенно относительно больших размеров, определялись очаговые некрозы, которые в части опухолей были множественными, обширными и образовывали ландшафтообразные структуры, и среди них встречались некрозы с палисадообразным расположением опухолевых клеток. У 2-х из 9-и крыс при введении Докс-PLGA в ступенчатых серийных срезах головного мозга был выявлен только глиальный рубец, в зоне рубца у одного животного были обнаружены единичные опухолевые клетки и их небольшие скопления. При введении Докс животным с ГБ 101.8 в ступенчатых серийных срезах головного мозга был выявлен только глиальный рубец, в зоне рубца

у одного животного были обнаружены сидерофаги. В перитуморальной зоне выявлен сетчатый, периваскулярный и перицеллюлярный отек, что также описано при ГБ у человека (Johnson P.J. et al., 2022). Выявленные при морфологическом исследовании особенности ГБ 101.8 у крыс соответствуют основным критериям ГБ человека (Авцын А. П., 1988), которая также характеризуется высокой атипичией опухолевых клеток, наличием большого количества кровеносных сосудов с образованием розеток и очаговой пролиферацией эндотелия, палисадообразных некрозов и кровоизлияний. ГБ IDH-дикого типа характеризуются некротическим центром соломенного цвета или желтоватыми пятнами, которые связаны с разрушением миелина, и кровоизлияниями (Alaverdyan A.E. et al., 2021).

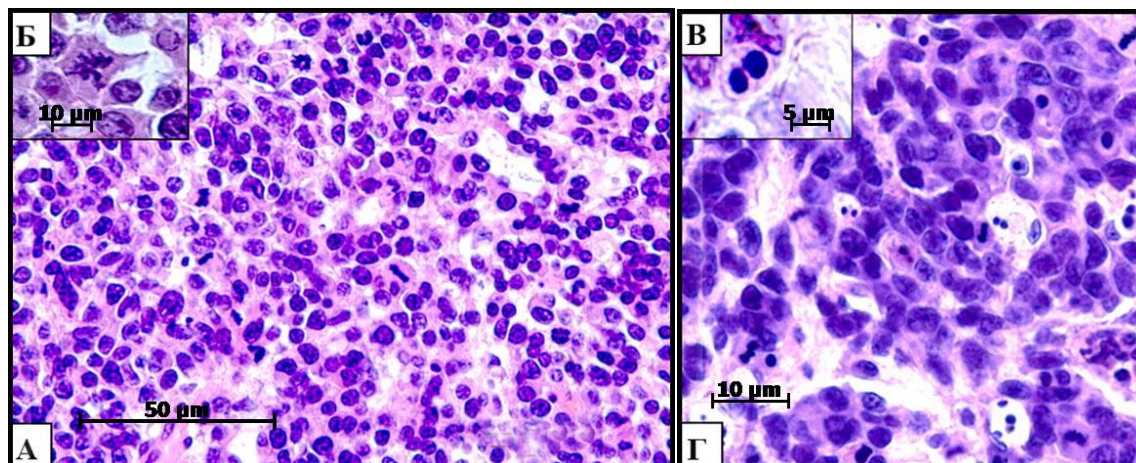


Рисунок 4. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8. А – Опухоль представлена полиморфными атипическими клетками с гиперхромными ядрами и узким ободком цитоплазмы. А, Б – митозы. В – гниущая клетка. Г – гниущие клетки, картина «звездного неба». Окраска гематоксилином и эозином.

При иммуногистохимическом исследовании в ГБ 101.8 у крыс без введения ЛП GFAP-позитивные структуры были расположены в периферической зоне опухоли, в то время как при введении Докс и Докс-PLGA – в периферических и центральных ее областях. Экспрессию GFAP обнаруживают в клетках ГБ на ранних стадиях роста опухоли, и она снижается по мере ее роста (Wohlfart S. et al. 2011), что может быть связано с реакцией глиальных клеток головного мозга на его повреждение при трансплантации опухоли. GFAP-позитивные клетки локализовались преимущественно в периферической зоне опухоли с периваскулярным распространением к ее центру. Пролиферация глиальных клеток является реактивным процессом, развивающимся в ответ на повреждение тканей головного мозга, распространением опухоли и связана с их барьерной функцией (Сухорукова Е.Г., 2011).

Таким образом, при морфологическом исследовании ГБ 101.8 при введении животным как Докс, так и Докс-PLGA выявлены признаки лекарственного патоморфоза – меньшие размеры опухолей, меньшая частота прорастания стенки правого желудочка головного мозга, меньшее количество опухолей с некрозами. После воздействия химиопрепаратов появились крупные, полиплоидные многоядерные клетки - «терапевтические гиганты», увеличивалось число клеток с признаками гибели и уменьшалось число сосудистых розеток. Согласно данным М.А. Sliwinska et al. (2009)

Докс может индуцировать полиплоидию, анеуплоидию, а также апоптоз, некроз (Mosieniak G. et al., 2015) и гибель клеток опухоли в результате митотической катастрофы, сопровождающейся изменением фенотипа клеток опухоли по пути стареющих клеток (Eom Y.W. et al., 2005). Опухоли, которые избегают стрессоров с помощью образования полиплоидных клеток, имеют тенденцию к рецидивированию, более агрессивному течению и устойчивости к терапии (Erenpreisa J. et al., 2007, 2013; Salmina K. et al., 2019; White-Gilbertson S. et al., 2020).

Однако, на качественном уровне признаки лекарственного патоморфоза ГБ 101.8 у животных, после введения Докс и Докс-PLGA не являются доказательными. В связи с этим нами были количественно оценены пролиферативная активность опухолевых клеток, процессы их гибели, число сосудов в опухоли и содержание VEGF A в сыворотке крови животных с опухолью без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA.

4. Сравнительная оценка пролиферативной активности опухолевых клеток глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA. Значения Ki67, как независимого прогностического фактора при ГБ, в литературе и клинических рекомендациях не установлены (Alkhaibary A. et al., 2018). В группах животных при введении Докс и Докс-PLGA лекарственный патоморфоз опухоли морфологически проявлялся изменением кинетики опухолевого роста – баланса пролиферативных процессов и гибели опухолевых клеток. В обеих группах животных, при введении Докс и Докс-PLGA, по сравнению с крысами без введения ЛП, количество митозов было меньше, но статистически значимых различий показателей между сравниваемыми группами не было (табл.). Для сравнительной оценки пролиферативной активности опухолевых клеток в ГБ 101.8 у животных разных экспериментальных групп использовали иммуногистохимический метод окрашивания с антителами к Ki67 – маркеру, экспрессируемому во всех фазах клеточного цикла, кроме G0 (рис. 5). По данным оценки содержания Ki67-позитивных клеток в опухолях статистически значимые отличия были выявлены только между группами животных, при введении Докс-PLGA и без введения ЛП (рис 6), что согласуется с исследованиями S. Steiniger et al. (2004), I. Nekmatara et al. (2009), S. Wohlfart et al. (2009), S. Wohlfart et al., (2011). Ряд авторов показали положительную (Bredel M. et al., 2002; Wong E. et al., 2018), а другие отрицательную корреляцию (Yoshida Y. et al., 2010) или ее отсутствие (Alkhaibary A. et al., 2018) между индексом Ki67 и общей выживаемостью у пациентов с ГБ. Возможно, опухоли с более высоким индексом пролиферации могут быть более чувствительны к терапии (Wong E. et al., 2018), в том числе к химиотерапии (Стрункин Д.Н. с соавт., 2022).

Таким образом, при введении крысам с ГБ 101.8 Докс-PLGA в опухолях статистически значимо снижается содержание Ki67-положительных клеток, что отражает снижение пролиферативной активности.

5. Сравнительная оценка клеток с морфологическими признаками гибели в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA. Ключевым фактором в реакции клеток опухоли на химиотерапию является активация их гибели. У животных, при введении Докс число клеток с признаками гибели в ГБ 101.8 на стандартной площади среза было выше, чем у животных без введения ЛП (табл.). Считают, что терапевтическая концентрация Докс

в клетках опухоли и эффективность лечения экспоненциально возрастают с увеличением накопления и постепенной биodeградации НЧ Докс-PLGA внутри опухоли (Brocato T.A. et al., 2018).

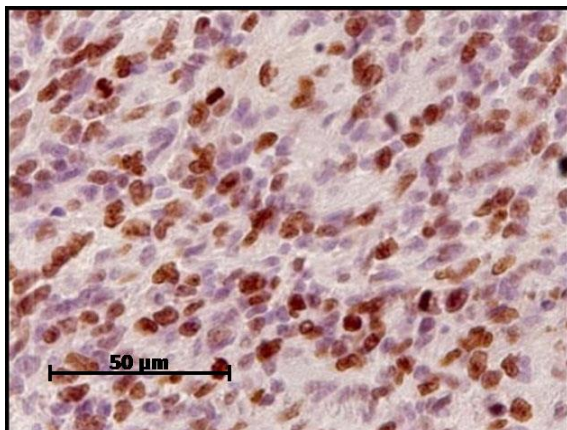


Рисунок 5. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki67. Иммунопозитивная реакция в ядрах клеток глиобластомы 101.8 у животных при введении Докс-PLGA. Окраска гематоксилином

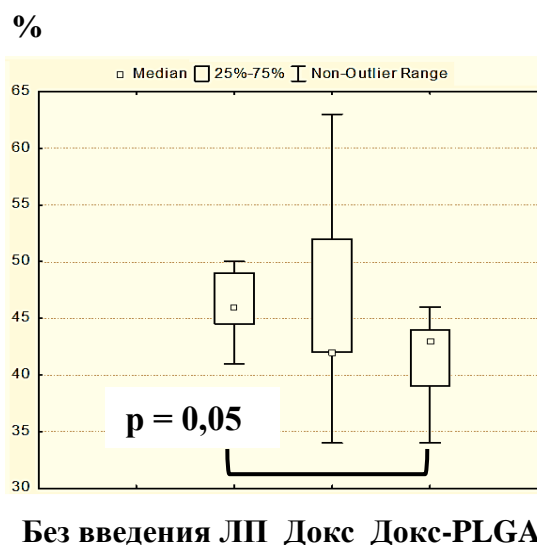


Рисунок 6. Содержание Ki67-позитивных клеток в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов (ЛП) и при введении Докс и Докс-PLGA

6. Коэффициент клеточного обновления в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA. Терапия динамически изменяет существующий баланс деления/гибели – обновления клеток опухоли, а также их фенотип (Bae, S.Y. et al., 2020). По сравнению с животными без введения лекарственных препаратов ККО в ГБ 101.8 был статистически значимо ниже как после введения Докс ($p=0,002$), так и после Докс-PLGA ($p=0,04$). Коэффициент клеточного обновления в ГБ 101.8 не различался у животных после введения Докс-PLGA и Докс (табл.). Для реализации противоопухолевого действия Докс – образования АФК, необходима его биоактивация до семихинонового радикала в тканях опухоли. Однако некоторые резистентные опухолевые клетки не могут активировать Докс и АФК не образуются (Sinha B.K., 2020). Большему накоплению в тканях опухоли PLGA-НЧ, которые состоят из молочной и гликолевой кислот, может способствовать повышенная экспрессия рецепторов этих кислот на опухолевых клетках. Известно, что имплантация клеток опухоли *in vivo* приводит к значительному повышению количества рецепторов лактата (Roland C.L. et al., 2014). Показано, что лактат в НЧ цитотоксичен для клеток ГБ *in vitro* и *in vivo* (Chavarria V. et al., 2022).

Таким образом, коэффициент клеточного обновления в ГБ 101.8 у животных, при введении Докс и Докс-PLGA, были статистически значимо ниже, чем в группе животных без введения ЛП.

7. Характеристика кровеносных сосудов глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA. Для сравнительного исследования ангиогенеза в ГБ 101.8 крыс без введения ЛП и при лекарственном патоморфозе, вызванном введением Докс и Докс-PLGA, оценивали

степень васкуляризации опухоли методом подсчета числа сосудов на стандартной площади среза. Сосуды выявляли при гистохимическом окрашивании изолектином В4. Согласно результатам исследования у животных при введении Докс и Докс-PLGA количество сосудов снижалось относительно группы животных без введения ЛП, но достоверные различия выявлены только в группе животных при введении Докс (табл.).

Таким образом, при введении Докс выявлено статистически значимое снижение количества сосудов в ГБ 101.8 относительно группы без введения ЛП, в то время как при введении Докс-PLGA этот показатель не отличался от группы без введения ЛП и животных, которым вводили Докс.

8. Иммуноферментный анализ содержания белка VEGF А в сыворотке крови у животных с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA. Васкуляризация опухоли регулируется многими факторами, в том числе секретируемыми клетками опухоли. Одним из ключевых факторов является эндотелиальный фактор роста сосудов. По данным иммуноферментного анализа содержания белка VEGF А в сыворотке крови у животных сравниваемых групп, статистически значимо не различалось (табл.). Полученные нами результаты согласуются с данными (Stockhammer G. et al., 2000), которые показали, что повышение, до 650 раз выше нормы, концентрации VEGF в опухолях головного мозга человека не отражается на уровнях VEGF в сыворотке крови. Кроме того, не было обнаружено существенных различий в общей выживаемости пациентов и интенсивности окрашивания антителами к VEGF на гистологических срезах ГБ (Loureiro L.V.M. et al., 2020).

Таким образом, у животных с ГБ 101.8 без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA содержание белка VEGF А в сыворотке крови не различалось.

II. ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ДОЗ ДОКС И ДОКС-PLGA

1. Морфологическое и биохимическое исследование кардиотоксичности Докс и Докс-PLGA у крыс с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA. При морфологическом исследовании сердца у крыс с ГБ 101.8 без введения ЛП патологических изменений не было выявлено. При введении животным Докс в миокарде обнаружены признаки острого токсического миокардита – очаги некроза, межучный отек, воспалительная инфильтрация гистиоцитами и лимфоцитами. При введении животным Докс-PLGA патоморфологические изменения в миокарде были менее выражены, чем в группе крыс, после введения Докс. По сравнению со стандартными формами, НЧ с антрациклинами, снижают их токсичность, так по клиническим данным эти ЛП реже вызывают застойную сердечную недостаточность, нейтро- и тромбоцитопению, миелосупрессию, алопецию (Rafiyath S.M. et al., 2012). У животных с ГБ 101.8 без введения ЛП, активность КФК в сыворотке крови была повышена, по сравнению с референсными значениями в популяции интактных крыс. Повышение активности КФК отражает повреждение метаболически активных тканей, которые активно потребляют АТФ, в частности, клетки головного мозга, опухолевые клетки и кардиомиоциты.

У животных с ГБ 101.8, при введении Докс-PLGA повышение активности КФК, как общей, так и сердечной ее изоформы, было статистически значимо меньше, чем в группе крыс, при введении Докс и у животных с опухолью без введения ЛП (рис. 7).

На поздней стадии развития ГБ 101.8 у крыс без введения ЛП обнаружено достоверное повышение активности АСТ в сыворотке крови по сравнению с референсными значениями, что, очевидно, связано с интенсивным процессом роста и распада опухоли и выходом ростовых факторов, продуктов метаболизма опухоли, клеточных ферментов в кровотоки, которые влияют на выраженность паранеопластического синдрома (Zucchi R., 2003; Pereverzeva E. et al., 2019). Активность АСТ была статистически значимо ниже в группах животных с ГБ 101.8, при введении Докс и Докс-PLGA, однако после введения Докс-PLGA активность АСТ была наименьшей. Коэффициент де Ритиса (соотношение активности АЛТ/АСТ в сыворотке крови) был статистически значимо выше референсных значений для всех исследуемых групп животных. Большая активность АСТ по сравнению с АЛТ, свидетельствует о большей кардио- и меньшей гепатотоксичности Докс и Докс-PLGA. Наиболее высокие его значения были в группе животных с ГБ, что связано с интенсивными процессами роста и распада в опухоли на поздней стадии ее развития, а наименьшие в группе животных, после введения Докс-PLGA (рис. 8). Повышение активности АСТ и коэффициента де Ритиса свидетельствует о гибели кардиомиоцитов при токсическом миокардите (Бабак О.Я. 2006.; Ющук Н.Д., 2010; Lazo M., 2022). Для снижения пиковых концентраций Докс рекомендована пролонгированная инфузия препарата, которая снижает тяжесть кардиомиопатии, вызванной Докс (Doroshov J.H. et al., 2020). Поэтому Докс в составе НЧ, за счет постепенной биодеградации позволяет избежать пиковых концентраций Докс и, таким образом, снизить его токсичность.

Таким образом, по данным морфологического и биохимического исследования у животных с ГБ 101.8, по сравнению с Докс терапевтические дозы Докс-PLGA оказывают менее выраженное кардиотоксическое действие.

2. Морфологическое и биохимическое исследование гепатотоксичности у крыс с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA. У крыс с ГБ 101.8 без введения ЛП патоморфологические изменения в печени не выявлены. У крыс при введении как Докс, так и Докс-PLGA гепатоциты периферических отделов долек были в состоянии умеренной мелко- и среднекапельной вакуольной дистрофии. Сравнительная оценка активности фермента АЛТ, в большей степени отражающая повреждение клеток печени (Amacher D.E., 1998; Shivakumar P. et al., 2012), показала статистически значимое его увеличение в сыворотке крови крыс с ГБ 101.8, после введения Докс. Однако активность АЛТ была в пределах референсных значений у животных без опухоли. При этом Докс-PLGA не вызывал статистически значимого повышения активности этого фермента и был также в пределах референсных значений интактной популяции крыс (рис.8).

Таким образом, по данным биохимических и патоморфологических исследований терапевтические дозы Докс и Докс-PLGA у крыс с ГБ 101.8 оказывали слабо выраженное гепатотоксическое действие.

3. Морфологические изменения почек у крыс при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA. Патологические изменения в почках у интактных животных не были выявлены, почечные клубочки были с неравномерным полнокровием капиллярных петель, просветы проксимальных и прямых извитых канальцев узкие. Щеточная каемка ярко эозинофильная, с выраженной равномерной положительной ШИК-реакцией (рис.9). Петли Генле были со свободными просветами, выстланы

Таблица

Медианы (0,25; 0,75) количества митозов, Ki67-позитивных, гибнущих клеток, коэффициента клеточного обновления (ККО), количества кровеносных сосудов в глиобластоме 101.8 и содержания белка VEGF A в сыворотке крови у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA

| Группы наблюдения | Фигуры митозов, (абс. число на стандартной площади среза 65 025 мкм ² , x 400) | Ki67-позитивные клетки, % (не менее чем на 1000 клеток опухоли, x 400) | Гибнущие клетки, (абс. число на стандартной площади среза 65 025 мкм ² , x 400) | Коэффициент клеточного обновления (ККО); (соотношение митотически делящихся к гибнущим клеткам) | Количество кровеносных сосудов (абс. число на стандартной площади среза 65 025 мкм ² , x 200) | Содержание белка VEGF A в сыворотке крови животных (пг/мл) |
|---|---|--|--|---|--|--|
| 1.Без введения лекарственных препаратов (n=7) | 15,0 (11,1; 19,2) | 46,0 (44,0; 49,0) | 2,0 (1,1; 2,5) | 6,5 (4,2; 13,1) | 5,0 (4,0; 6,5) | 7,9 (7,3;8) |
| 2.При введении Докс (n=9) | 11,0 (9,0; 14,3) | 42,5 (42,5; 52,0) | 10,0 (7,0; 13,5) | 1,0 (0,9; 1,4) | 3,5 (2,0; 4,0) | 7 (5;10) |
| 3.При введении Докс-PLGA (n=8) | 10,0 (6,0; 14,2) | 43,5 (39,0; 44,0) | 8,0 (4,2; 14,5) | 1,5 (0,5; 4,4) | 4,0 (2,0; 4,0) | 8,3 (6,4;9,4) |
| Статистически значимые различия между группами наблюдения | | p₍₁₋₃₎ = 0,05 | p₍₁₋₂₎ =0,03 | p₍₁₋₂₎ =0,002 p₍₁₋₃₎ =0,04 | p₍₁₋₂₎ =0,05 | |

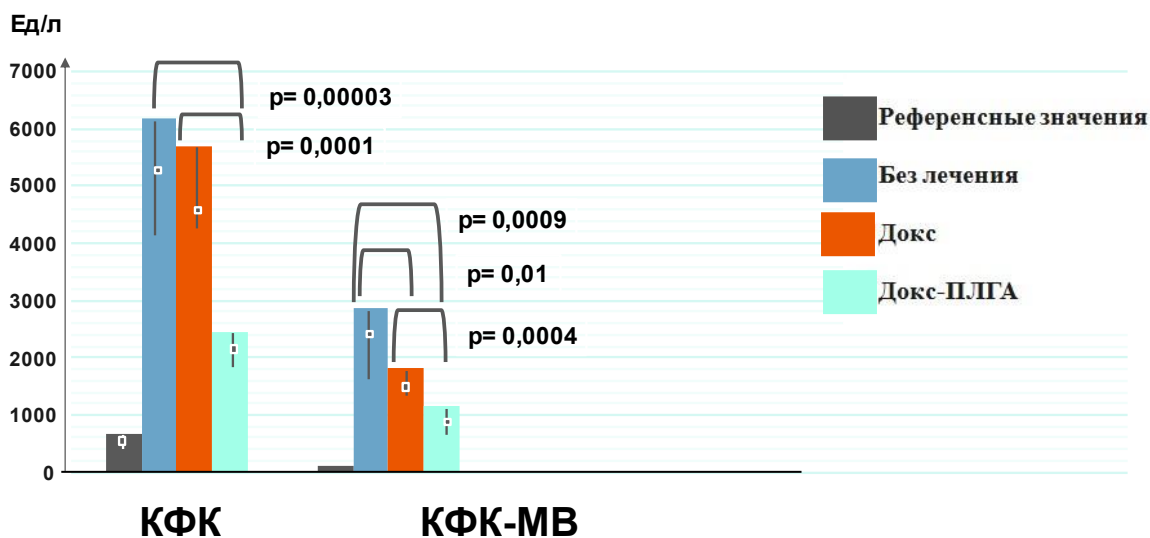


Рисунок 7. Биохимическое исследование активности КФК и КФК-МВ в сыворотке крови интактных крыс, с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA (Me 25%-75%)

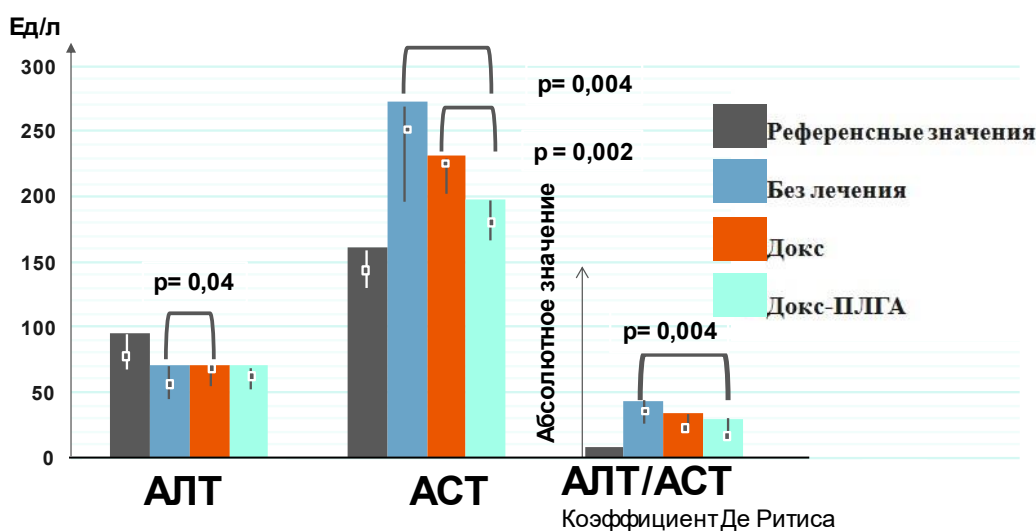


Рисунок 8. Биохимическое исследование активности АЛТ, АСТ в сыворотке крови и коэффициент де Ритиса у интактных животных, с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов, и при введении Докс и Докс-PLGA (Me 25%-75%)

кубическим эпителием. Дистальные извитые и прямые каналцы со свободными просветами, эпителий кубический с четкими контурами ядра и цитоплазмы. Собирательные трубочки с широкими просветами без содержимого, выстланы плоским эпителием. При морфологическом и ультраструктурном исследовании эпителиоциты проксимальных и дистальных каналцев и собирательных трубочек имели нормальное строение.

На 8-е и 21-е сутки после введения животным Докс и Докс-PLGA, почечные клубочки были с тонкими неравномерно полнокровными капиллярными петлями. Просветы многих проксимальных и дистальных извитых и прямых каналцев были расширены, в них выявлены единичные десквамированные эпителиальные клетки и

отложения эозинофильных зернистых масс. Люминальная поверхность эпителиоцитов с нечеткими границами, отмечали снижение интенсивности окрашивания гликопротеинов щеточной каемки при ШИК-реакции и ее разрушение (рис. 9, 10). В просветах собирательных трубочек были гомогенные зернистые эозинофильные массы (цилиндры). При ультраструктурном исследовании в проксимальных канальцах обнаружено повреждение щеточной каемки, в дистальных канальцах и собирательных трубочках – набухание ядер эпителиоцитов, образование крупных вакуолей в цитоплазме клеток, десквамация эпителия, фрагменты гибнущих клеток, просветы заполнены волокнистыми структурами. Описанные выше патоморфологические изменения были менее выраженными у животных, которым вводили Докс-PLGA.

Таким образом, после курсового введения терапевтических доз Докс и Докс-PLGA как на 8-е, так и на 21-е сутки в почках выявлены дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных извитых и прямых канальцев. В проксимальных канальцах обнаружено разрушение щеточной каемки и снижение содержания в ней гликопротеинов.

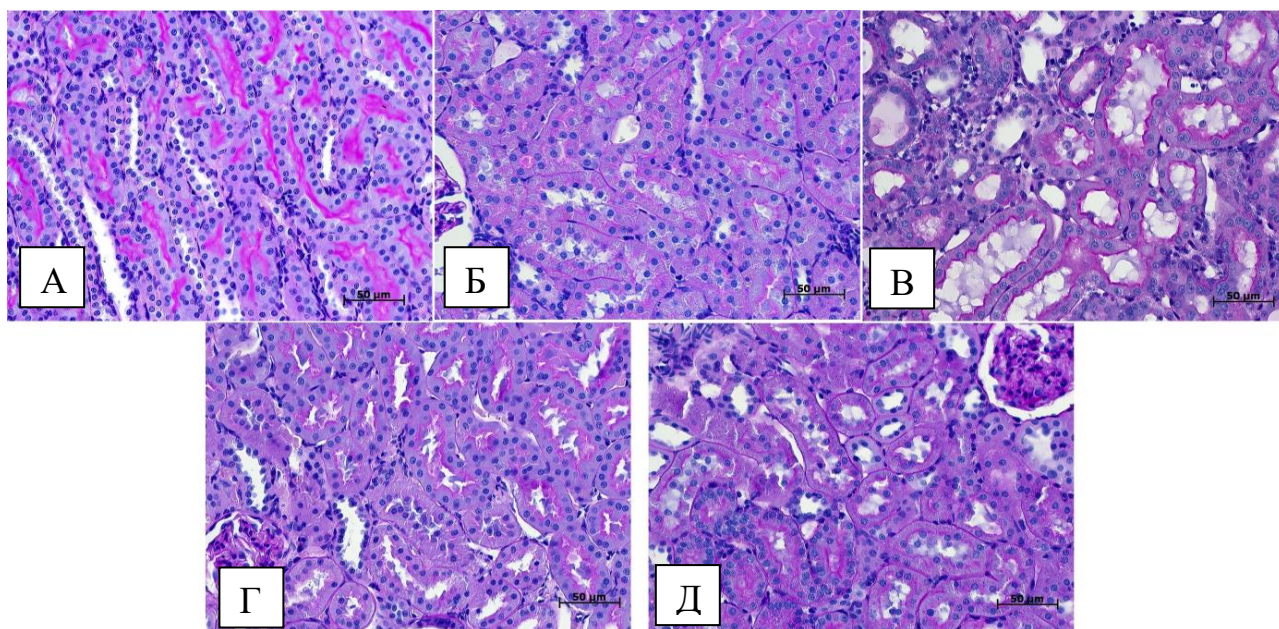


Рисунок 9. Щеточная каемка в проксимальных канальцах почки. Интактные животные (А), после введения терапевтических доз: Докс, на 8-е сутки (Б); Докс, на 21-е сутки (В); Докс-PLGA на 8-е сутки (Г), Докс-PLGA на 21-е сутки (Д). А – интактная группа, щеточная каемка проксимальных канальцев почки определяется на всем протяжении, ШИК-реакция выражена. Б, В, Г, Д – просветы проксимальных канальцев почки расширены, щеточная каемка слабо ШИК-положительная и разрушена. Окраска – ШИК-реакция и гематоксилин

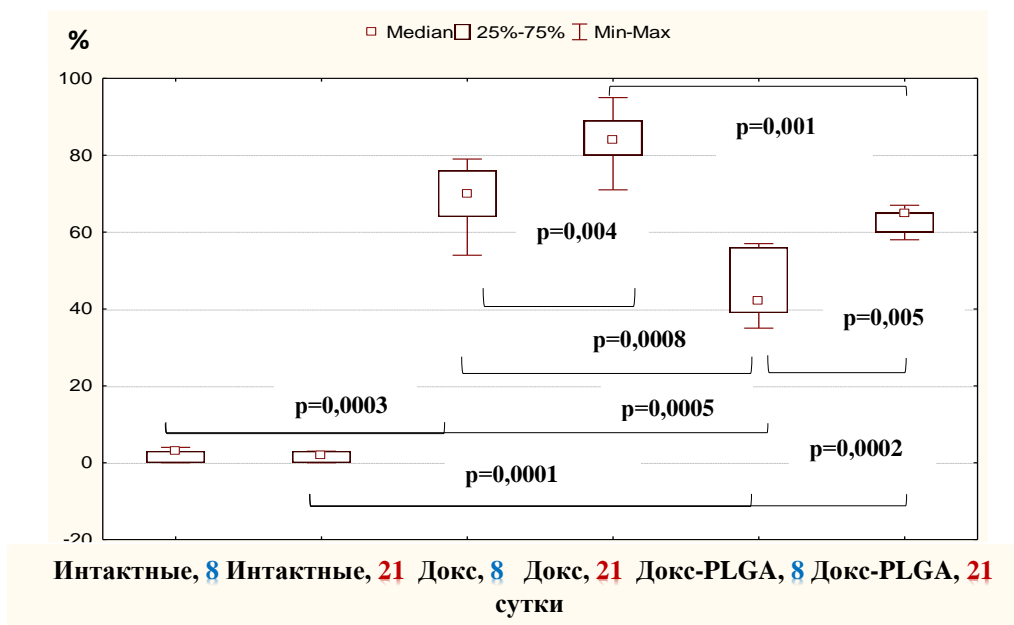


Рисунок 10. Доля проксимальных канальцев нефрона с нарушенной щеточной каемкой у крыс после введения Докс и Докс-PLGA на 8-е и 21-е сутки

При морфометрическом исследовании показано, что после введения терапевтических доз как Докс, так Докс-PLGA доля проксимальных канальцев с нарушением щеточной каемки была достоверно выше на 21-е, чем на 8-е сутки. На 8-е и на 21-е сутки нефротоксический эффект Докс был более выраженным по сравнению с Докс-PLGA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования по оценке противоопухолевого эффекта Докс и Докс-PLGA на модели ГБ 101.8 у крыс показано, что терапевтические дозы обеих форм Докс оказывают противоопухолевое действие. При морфологическом исследовании ГБ 101.8 при введении крысам Докс и Докс-PLGA выявлены признаки лекарственного патоморфоза – снижение размеров опухолей, частоты прорастания стенки правого желудочка головного мозга, количества опухолей с некрозами, числа сосудистых розеток. У животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA, отмечали увеличение средней продолжительности жизни, снижение показателей объема опухолей, торможение их роста и уменьшение коэффициента клеточного обновления. В группе животных, при введении Докс-PLGA, относительно группы Докс, 22% животных выжило, уменьшилась доля больших опухолей за счет преобладания небольших и микроопухолей, а торможение роста ГБ 101.8 было наибольшим. Противоопухолевый эффект Докс при ГБ 101.8 обусловлен увеличением числа гибнущих опухолевых клеток и снижением количества маркированных изолектином В4 кровеносных сосудов, а Докс PLGA – пролиферирующих Ki67-положительных клеток. У животных без введения лекарственных препаратов GFAP-позитивные структуры нейроглии определялись только на периферии опухолей, а при введении обоих лекарственных препаратов они располагались перитуморально с

распространением к центру опухоли. Содержание в сыворотке крови фактора роста сосудов – VEGF A в сравниваемых группах статистически значимо не различалось.

Более высокий противоопухолевый эффект Докс-PLGA, по сравнению с Докс, может быть обусловлен тем, что в клетках опухоли концентрации Докс были выше, за счет биораспределения и пролонгированной циркуляции НЧ с постепенным высвобождением Докс, большей биодоступности наносомальной формы Докс для клеток опухоли, преодоления множественной лекарственной устойчивости, способности НЧ проникать в клетки опухоли и снижать pH, что также способствует торможению пролиферации и большему накоплению Докс в клетках опухоли.

Сравнительное исследование Докс и Докс-PLGA позволило установить, что Докс-PLGA оказывает менее выраженное кардио- и нефротоксическое действие. При исследовании кардиотоксичности у животных с ГБ 101.8, после введения Докс-PLGA, очаговые воспалительные изменения в миокарде были менее выраженными, значения активности КФК как общей, так и ее сердечной изоформы (КФК-МВ), АСТ в сыворотке крови и коэффициент де Ритиса были меньше, чем в группах крыс, при введении Докс и без введения лекарственных препаратов.

Гепатотоксическое действие терапевтических доз Докс и Докс-PLGA было слабо выражено и характеризовалось дистрофическими изменениями гепатоцитов. Активность АЛТ была ниже в группе животных без введения лекарственных препаратов, чем у крыс, при введении Докс, однако во всех группах наблюдения показатели находились в пределах референсных значений.

Терапевтические дозы Докс и его PLGA-наночастицы на 8-е и 21-е сутки в почках вызывали дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных извитых и прямых канальцев. При исследовании нефротоксичности в проксимальных канальцах при гистохимическом и ультраструктурном исследовании обнаружено разрушение щеточной каемки и снижение содержания в ней гликопротеинов. По сравнению с Докс, при введении его PLGA-наночастицы, доля проксимальных канальцев с нарушением щеточной каемки была ниже как на 8-е, так и на 21-е сутки наблюдения, что отражает менее выраженный нефротоксический эффект Докс-PLGA.

Полученные в исследовании данные о морфологической характеристике, отражающие противоопухолевый эффект и токсическое действие терапевтических доз доксорубина и его PLGA-наночастицы на модели ГБ, следует учитывать при разработке новых подходов к лечению ГБ у человека.

ВЫВОДЫ

1. Курсовое введение крысам с глиобластомой 101.8 терапевтических доз доксорубина (Докс) и доксорубина в составе наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот (Докс-PLGA) оказывает противоопухолевый эффект, который характеризуется увеличением продолжительности жизни животных, снижением обновления клеток опухоли и торможением ее роста.
2. Противоопухолевый эффект Докс у животных с глиобластомой 101.8 обусловлен увеличением числа гибнущих опухолевых клеток и снижением количества маркированных изолектином В4 кровеносных сосудов, а Докс-PLGA уменьшением содержания Ki67-положительных пролиферирующих клеток. Уровень фактора роста сосудов – VEGF A в сыворотке крови в сравниваемых группах статистически значимо не различался.

3. По данным волюмометрической оценки опухолей по сравнению с нелечеными животными средний объем глиобластомы 101.8 был меньше в 48 раз при введении Докс-PLGA, а Докс в 7 раз. У животных без введения лекарственных препаратов GFAP-позитивные структуры нейроглии определялись только на периферии опухолей, а при введении обоих лекарственных препаратов они располагались перитуморально с распространением к центру опухоли.

4. По сравнению с животными с глиобластомой 101.8, которым не вводили лекарственные препараты, при введении Докс-PLGA продолжительность жизни крыс увеличивалась на 84%, а выживаемость на 22%, в то время как при введении Докс, на 25 и 0% соответственно.

5. После курсового введения животным с глиобластомой 101.8 Докс и Докс-PLGA в сердце выявлен токсический миокардит, характеризовавшийся воспалительной инфильтрацией и некрозом кардиомиоцитов. Активность общей и сердечной изоформы КФК, АСТ в сыворотке крови и коэффициент де Ритиса у животных всех исследованных групп были статистически значимо выше референсных значений. При этом у крыс, получавших Докс-PLGA, исследованные показатели были статистически значимо ниже, что связано с меньшей кардиотоксичностью. В печени при морфологическом исследовании обнаружены дистрофические изменения гепатоцитов, которые в сравниваемых группах не различались по степени тяжести, активность АЛТ была в пределах референсных значений во всех группах наблюдения.

6. При введении крысам терапевтических доз Докс и Докс-PLGA в почках на 8-е и 21-е сутки выявлены дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных извитых и прямых канальцев. В проксимальных канальцах при гистохимическом и ультраструктурном исследовании обнаружено разрушение щеточной каемки и уменьшение содержания в ней гликопротеинов. В почках у животных при введении как Докс, так и Докс-PLGA данные изменения были более выражены на 21-е сутки. По сравнению с Докс при введении Докс-PLGA доля проксимальных канальцев с разрушенной щеточной каемкой была статистически значимо ниже, что отражает менее выраженный нефротоксический эффект.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. Мхитаров В.А., Макарова О.В., Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Халанский А.С., Михайлова Л.П., Гельперина С.Э., Максименко О.О., Разживина В.А., Балабаньян В.Ю. Методика оценки объема экспериментальных опухолей с помощью 3D реконструирования // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2015.-№4.- С. 42-47
2. Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Халанский А.С., Мхитаров В.А., Цветков И.С., Малиновская Ю.А., Максименко О.О., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю., Разживина В.А., Гореликов П.Л., Михайлова Л.П., Макарова О.В. Противоопухолевая активность доксорубина в составе поли(лактид-ко-гликолидных) наночастиц при экспериментальной глиобластоме // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2017.- № 2.- С. 65-71
3. Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Постовалова Е.А., Халанский А.С., Разживина В.А., Гельперина С.Э., Макарова О.В. Лекарственный патоморфоз глиобластомы 101.8 у крыс Вистар при лечении наноразмерной формой доксорубина на основе полилактидных наночастиц // Современные технологии в медицине. - 2018. - Т. 10. - № 4. - С. 105-112
4. Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, Osipova N., Razzhivina V, Arantseva D, Yarovaia O, Mostovaya U, Khalansky A, Fedoseeva V (Куделькина В.В.). et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development // Int J Pharm. 2019; V.572. Article 118733. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733
5. Куделькина В.В., Халанский А.С., Макарова О.В., Хомякова Т.И., Цветков И.С., Косырева А.М., Алексеева А.И., Максименко О.О., Разживина В.А., Гельперина С.Э. Сравнительная морфологическая и биохимическая характеристика токсического действия доксорубина и PLGA-доксорубина при лечении экспериментальной глиобластомы // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2021. - № 1 (10). - С. 58-65. doi:<https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.1.58-65>
6. Цветков И.С., Золотова Н.А., Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Куделькина В.В., Черников В.П., Мхитаров В.А., Михайлова Л.П., Соболева Н.И., Разживина В.А., Добрынина М.Т., Гельперина С.Э., Макарова О.В. Морфологическая характеристика нефротоксического действия доксорубина и наносомальной формы поли-лактид-ко-гликолид (PLGA)-доксорубина // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2022. - Т. 10, S4. - С. 77-86. doi:<https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.S4.77-86>

Другие публикации

7. Tsvetkov I, Zolotova N, Kosyрева A, Dzhalilova D, Mikhailova L, Kudelkina V, Shelkov A, Makarova O, Chernikov V, Razzhivina V. Morphological Value of Nephrotoxic Effects of Doxorubicin and PLGA-Doxorubicin. Medical Sciences Forum. 2021; 7(1), P.13. <https://doi.org/10.3390/ECMS2021-10834>
8. Хомякова Т.И., Макарова О.В., Халанский А.С., Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Михайлова Л.П., Хомяков Ю.Н. Экспериментальные модели мультиформной глиобластомы человека // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2015.- №1.- С.60-69 (обзор литературы)
9. Gelperina S., Khalansky A., Maksimenko O., Malinovskaya Y., Fedoseeva V. (Куделькина В.В.), Razzhivina V., Melnikov P., Baklaushev V., Pereverzeva E., Treschalin I., Makarova O., Balabanyan V. Nanoparticle-bound doxorubicin for chemotherapy of glioblastoma: from fundamental research to clinics // II International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma. Nanoparticle-bound doxorubicin for chemotherapy of glioblastoma. – Spain. – 2015
10. Gelperina S., Makarova O., Khalansky A. S., Maksimenko O, Malinovskaya J., Fedoseeva V. (Куделькина В.В.), Razzhivina V., Melnikov P., Baklaushev V., Pereverzeva E., Treschalin

- I., Balabanyan V. Efficient chemotherapy of glioblastoma with nanoparticle-bound doxorubicin: From bench to bedside // European Nanomedicine Meeting. – France. – 2015
11. Цветков И.С., Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Мхитаров В.А., Халанский А.С., Гореликов П.Л., Гельперина С.Э., Максименко О.О., Разживина В.А., Балабаньян В.Ю. Макарова О.В. Эффективность доксорубина в составе полимерных наночастиц при лечении экспериментальной глиобластомы 101.8 // Научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – Москва. – 2016
12. Gelperina S., Makarova O., Khalansky A. S., Maksimenko O, Malinovskaya J., Fedoseeva V. (Куделькина В.В.). Doxorubicin loosely bound to the nanoparticle surface contributes to the antitumour activity of nanoparticles against an intracranial tumour. // 210 Th world meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. – Glasgow. – 2016
13. Мхитаров В.А., Макарова О.В., Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Халанский А.С., Михайлова Л.П. Определение объема экспериментальных опухолей методом 3D-реконструкции // Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов. – Челябинск. – 2017. – С.384
14. Gelperina S., Maksimenko O., Malinovskaya J., Namestnikova D., Khalansky A., Fedoseeva V. (Куделькина В.В.), Melnikov P., Gabashvili A., Kreuter J., Makarova O. Evaluation of anti-tumour effect of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles in two rat glioma models // VI International Symposium. Control release society annual meeting and exposition. – Boston. – 2017.
15. Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Мхитаров В.А., Гельперина С.Э., Халанский А.С., Цветков И.С., Максименко О.О., Разживина В.А., Гореликов П.Л., Макарова О.В., Балабаньян В.Ю. Противоопухолевое действие доксорубина в составе PLGA наночастиц при лечении экспериментальной глиобластомы 101.8. Материал V Съезда РОП. – Челябинск. – 2017. – С.338-339
16. Федосеева В.В. (Куделькина В.В.), Алексеева А.И., Халанский А.С., Копылов А.Н., Гореликов П.Л., Максименко О.О., Гельперина С.Э., Макарова О.В. Влияние физико-химических параметров PLGA наночастиц на противоопухолевую эффективность доксорубина при терапии экспериментальной глиобластомы 101.8 // Научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – Москва. – 2018.
17. Куделькина В.В., Макарова О.В., Цветков И.С., Косырева А.М. Кардио- и гепатотоксические эффекты терапевтических доз доксорубина и PLGA- доксорубина при лечении экспериментальной глиобластомы // Сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына). – Москва. – 2021. – С.110-111
18. Цветков И.С., Золотова Н.А., Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Куделькина В.В., Черников В.П., Мхитаров В.А., Михайлова Л.П., Соболева Н.И., Разживина В.А., Добрынина М.Т., Гельперина С.Э., Макарова О.В. Морфологическая характеристика нефротоксического действия доксорубина и наносомальной формы PLGA- доксорубина // Сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына). – Москва. – 2021. – С.213-214
19. Куделькина В.В. Экспериментальные тканевые и клеточные модели опухолей головного мозга // Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной онкологии». ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. – г. Ростов-на-Дону. – 2022