

**Научно-исследовательский институт морфологии человека
имени академика А.П. Авцына
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика
Б.В. Петровского»**

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

**Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель
Профессор, д. м. н. О.В. Макарова**

Москва-2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Современные представления об эпидемиологии, этиологии, факторах риска развития глиобластомы и ее лечении	12
1.2. Современная классификация глиом.....	14
1.3 Диффузные глиомы взрослого типа, 4 степени ВОЗ	15
1.4 Лечение пациентов с диффузными глиомами взрослого типа, 4 степени ВОЗ	18
1.5 Доксорубицин в терапии опухолей.....	25
1.6 Токсические эффекты доксорубина при химиотерапии опухолей	30
1.7 Гематоэнцефалический барьер и проблема доставки лекарственных веществ в мозг.....	38
1.8 Характеристика наноразмерных форм лекарственных веществ.....	47
1.9 Наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот	49
1.10 Моделирование опухолей головного мозга	53
ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	64
2.1 Лабораторные животные.....	64
2.2 Модель экспериментальной глиобластомы 101.8	66
2.3 Исследуемые фармакологические препараты.....	68
2.4 Методы экспериментальной онкологии	70
2.5 Гистологические методы исследования	72
2.6 Морфометрическое исследование размеров глиобластомы 101.8.....	74
2.7 Оценка противоопухолевого эффекта исследуемых препаратов на модели глиобластомы 101.8 крыс на основании подсчета торможения роста опухоли.....	77
2.8 Оценка митотической активности, клеток с признаками гибели и коэффициента клеточного обновления глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA.....	78
2.9 Оценка кровеносных сосудов в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA....	80
2.10 Биохимическое исследование сыворотки крови крыс с глиобластомой 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA.....	81
2.11 Оценка нефротоксичности у крыс терапевтических доз препаратов Докс и Докс-PLGA гистохимическим методом	81
2.12 Статистический метод.....	81

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	83
3.1 Результаты оценки общего состояния животных с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA	83
3.2 Оценка противоопухолевого эффекта терапевтических доз Докс и Докс-PLGA по продолжительности жизни и выживаемости животных с глиобластомой 101.8	85
3.3 Волюмометрическая оценка размеров глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA	88
3.4 Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA	93
3.5 Пролиферативная активность опухолевых клеток глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA	109
3.6 Сравнительная оценка клеток с морфологическими признаками гибели в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA	116
3.7 Характеристика кровеносных сосудов глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA ..	120
3.8 Характеристика GFAP-позитивных структур в глиобластоме 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA	124
3.9 Морфологические и биохимическое исследование кардиотоксического и гепатотоксического действия терапевтических доз Докс и Докс-PLGA у крыс с глиобластомой 101.8.....	125
3.10 Морфологические изменения почек у крыс при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA	132
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	172
ВЫВОДЫ.....	174
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	176
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	182

ВВЕДЕНИЕ

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 темазоломид, и при определенных в стандарте терапии условиях дополнительные 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 (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 глиобластомой 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 лаборатории 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 исследованы.

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; Nekmatara 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 и токсических эффектов. «Пустые» (плацебо) ПБЦА 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 доксорубицина и доксорубицина 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 ГБ, 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 Докс обусловлен увеличением числа гибнущих опухолевых клеток и снижением количества кровеносных сосудов окрашенных изолектином В4, а Докс-PLGA – снижением пролиферирующих Ki67-положительных клеток.

По сравнению с доксорубицином терапевтические дозы доксорубицина в составе PLGA-наночастиц характеризуется 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 Докс увеличивается число гибнущих опухолевых клеток и снижается количество кровеносных сосудов окрашенных изолектином В4, а Докс-PLGA – снижается количество пролиферирующих Ki67-положительных клеток опухоли. Терапевтические дозы доксорубицина в составе PLGA-наночастиц по сравнению с доксорубицином характеризуется 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 Докс и Докс-PLGA они располагаются перитуморально с распространением к центру опухоли.

Кардио- и нефротоксическое действие курсового введения терапевтических доз доксорубицина в составе PLGA-наночастиц по сравнению с доксорубицином 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-наночастиц на модели глиобластомы следует учитывать при разработке новых подходов к лечению ГБ 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 Pharmaceutics, 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 источника, из них 79 российских и 496 зарубежных. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 43 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления об эпидемиологии, этиологии, факторах риска развития глиобластомы и ее лечении

1.1.1 Эпидемиология

ГБ составляют около 15% среди всех опухолей головного мозга и являются наиболее распространенными первичными злокачественными опухолями у взрослых (Young R.M. et al., 2015). Агрессивный инфильтративный рост в тканях головного мозга затрудняет ее радикальное хирургическое удаление, что определяет неблагоприятный прогноз, даже при тщательном соблюдении стандартов лечения. ГБ может распространяться по путям тока ликвора, за пределы ЦНС она метастазирует только в 2 % случаев (Lun M. et al., 2011; Rosen J. et al., 2018).

По статистическим данным 2011-2016 гг в Российской Федерации пятилетняя выживаемость пациентов при ГБ составила 13% в возрасте 20-44 лет и 1% в возрастной группе от 55 до 64 лет (Каприн А.Д. с соавт., 2017). Смертность от всех опухолей ЦНС возросла с 2006 по 2016 год на 27 %, и она максимально высокая среди всех онкологических заболеваний (Каприн А.Д. с соавт., 2017). По данным онкологического регистра США вероятность развития злокачественной опухоли ЦНС в течение жизни составляет менее 0,5%, частота возникновения и летальности нарастает с возрастом (Bray F. et al., 2018). Выживаемость пациентов с ГБ в США в течение 1 года составляет 41,4% (Johnson D.R., et al., 2017), а 5-летняя варьирует в диапазоне 6-22% (Xu H. et al., 2017). Продолжительность жизни больных с ГБ зависит от возраста, этнической принадлежности больного, молекулярно-генетического статуса опухоли и проводимой терапии. По сравнению с европейцами более высокая выживаемость наблюдается в азиатской популяции, так дожитие до двух лет составляет в ней 50%, против 40% у европейцев (Ostrom Q.T. et al., 2018; Leese R. с соавт., 2017).

1.1.2 Этиология и факторы риска развития глиобластомы

В большинстве случаев причины возникновения ГБ не ясны, однако доказано возникновение опухолей ЦНС в результате воздействия радиации, при наследуемых синдромах, таких как Ли-Фраумени, Горлина, Линча, Тюрко, нейрофиброматоз 1/2 типа и спонтанных опухолевых синдромах, связанных с мутацией определенных генов (Scheurer M.E., et al., 2010; Huang Y.T. et al., 2017; Zheng L. et al., 2018; Caragher S.P. et al., 2019; Pruss M. et al., 2020). Изучается роль в развитии глиом нейротропных вирусов

(Strojnik T. et al., 2017; Krenzlin H. et al., 2019), электромагнитного излучения (Vienne-Jumeau A. et al., 2019) гипертиреоза (Costa L.E.S. et al., 2019), атопии и аллергии и других иммунных нарушений (Linos E. et al., 2007; Amirian E.S. et al., 2016).

Предполагают, что глиальные предшественники, астроциты и нейроны могут служить источником развития глиом (Bachoo R. et al., 2002; Friedmann-Morvinski D. et al., 2012), и что клетки, подвергающиеся начальным мутациям, могут не трансформироваться в опухолевые, в то время как их дочерние клетки изменяются и становятся источником опухоли (Zong H. et al., 2012; Zong H. et al., 2015). Показано, что плюрипотентные нейроны и астроциты при воздействии онкогенов могут вызывать глиомы у мышей (Friedmann-Morvinski D. et al., 2012). Эпигенетические нарушения регуляции популяции клеток-предшественников могут привести к возникновению опухолей (Feinberg A. et al., 2006). Возможно, что источником развития ГБ являются плюрипотентные нейральные стволовые клетки, которые находятся в зубчатой извилине гиппокампа и под эпендимой желудочков головного мозга (Rabkin C.S. et al., 1997; Yachida S. et al., 2010). Терапевтически важная субпопуляция клеток ГБ – плюрипотентные клетки опухоли самообновляются и дают начало всем типам клеток опухоли, в том числе резистентным к терапии (Mattei V., et al., 2021). Усиленная репарация ДНК и конститутивная экспрессия контрольных точек позволяет им выживать при лечении, когда они не пролиферируют (Meric-Bernstam F. et al., 2012; Chen W. et al., 2016; Annovazzi L. et al., 2017). Показана роль микроокружения, внеклеточного матрикса (Singh S. K. et al., 2004; Liebelt B.D. et al., 2016; Fidoamore A., 2016), нейронов (Gillespie S. et al., 2018) и кишечного микробиома в развитии ГБ и эффективности проводимой терапии (Mehrian-Shai R. et al., 2019). Астроциты защищают клетки ГБ от цитотоксических эффектов ХТ (Irvin D.M. et al., 2017; Chen W. et al., 2015; Chen W. et al., 2016), они способствуют разрушению внеклеточного матрикса, инвазии и прогрессии опухоли (Chen W. et al., 2016).

Особая популяция стареющих опухолевых и ассоциированных с опухолью клеток возникает в результате длительных неблагоприятных воздействий на клетки, например, повреждений ДНК, в том числе в результате ХТ, гипоксии, активации онкогенов (в частности АФК) и других, что приводит к остановке клеточного цикла р53-зависимым образом. Стареющие клетки опухоли и ее микроокружение могут участвовать в ремоделировании межклеточного матрикса, ангиогенезе и усиливать или снижать пролиферацию клеток (Hanahan D. 2022). Костномозговые и резидентные макрофаги

опухоли регулируют пролиферацию, выживание и миграцию клеток опухоли (Cotechini T. et al., 2021) популяций иммунных клеток, также они влияют на проницаемость ГЭБ и гемато-опухолевый барьер (Belykh E. et al., 2020).

Таким образом, причины и механизмы развития ГБ не ясны, однако доказано их возникновение после воздействия радиации и при наследуемых опухолевых синдромах.

1.2. Современная классификация глиом

Глиомы – это гетерогенная группа диффузных и ограниченных опухолей из нейроэпителиальных тканей (Taha M.S. et al., 2018; Wenger A. et al., 2022). Диффузные глиомы характеризуются инфильтрацией клеток в прилежащие ткани головного мозга, поэтому радикальная резекция этих опухолей затруднена. Глиомы, имеющие четкую границу и более компактную структуру, относятся к ограниченным. Диффузные глиомы являются наиболее распространенными злокачественными опухолями головного мозга у взрослых, часто рецидивируют, несмотря на терапию. Согласно пятой обновленной классификации ВОЗ опухолей ЦНС 2021 года глиомы разделены на 4 типа: диффузные глиомы взрослого типа, диффузные глиомы низкой степени злокачественности детского типа, диффузные глиомы высокой степени злокачественности детского типа и ограниченные астроцитарные глиомы (Louis D.N. et al., 2021). Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика глиом позволили определить и классифицировать их клинически значимые подтипы. В классификации ВОЗ 5-й редакции 2021 года к группе диффузных глиом взрослого типа 4 степени злокачественности отнесены 2 подгруппы опухолей с разными молекулярно-биологическими маркерами: 1) ГБ без мутаций в гене изоцитратдегидрогеназы (IDH-дикого типа) и 2) астроцитомы с мутациями в гене изоцитратдегидрогеназы (IDH-мутант) (Louis D.N. et al., 2021).

При определении степени злокачественности глиомы (1-4 степени злокачественности) пользуются одноименной классификацией опухолей ЦНС, разработанной в клинике Святой Анны-Майо, где учитываются не только морфологические особенности опухолевых клеток, но и клеточность опухоли, клеточная атипия, количество митозов, некрозов и пролиферация эндотелия, что позволяет оценивать эффективность проводимой терапии (Daumas-Duport C. et al., 1988). Данная классификация основана на полуколичественной суммарной оценке на основании четырех морфологических признаков: атипия ядер, количество фигур митозов и их

патологических форм, пролиферация эндотелиальных клеток и распространенность некрозов (0 – отсутствие признака, 1 – наличие, сомнительное проявление – 0) (табл.1).

Таблица 1

Критерии для оценки опухолей ЦНС по классификации клиники Святой Анны-
Майо

Критерий	Параметры, оцениваемые в баллах:
Ядерная атипия	Гиперхромия, явные изменения величины и формы
Митозы	Патологические митозы
Пролиферация эндотелия*	Просвет сосуда окружен нагроможденными эндотелиальными клетками
Очаги некрозов **	Множественные

*Гиперваскуляризация не учитывается; **Если имеются только псевдопалисады без очага некроза, то они не учитываются

Степень злокачественности глиомы оценивается по сумме баллов: 1 степень – 0; 2 степень – 1; 3 степень – 2; 4 степень – 3 или 4 балла. Двойное слепое исследование двумя независимыми морфологами дает воспроизводимый результат в 94% случаев глиом (Daumas-Duport C. et al., 1988). Установление патогистологического диагноза и оценку злокачественности могут затруднять гетерогенность опухолей, малое количество биопсийного материала, ошибки при взятии материала для исследования и мозаичность строения опухоли.

1.3 Диффузные глиомы взрослого типа, 4 степени ВОЗ

К диффузным глиомам взрослого типа 4 степени ВОЗ относят ГБ IDH-дикого типа с мутацией промотора *TERT* (TElomerase Reverse Transcriptase) и сочетанием увеличения 7-й хромосомы и уменьшения всей или части 10-й хромосомы, амплификации *EGFR* (epidermal growth factor receptor), а также астроцитому мутантную по IDH с характерными

абберациями в генах *IDH1/2*, *ATRX* (Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked), *TP53* (Tumor protein P53), *CDKN2A/B*.

ГБ IDH-дикого типа обязательно должна иметь молекулярно-генетические абберации – мутации промотора *TERT*, сочетанное увеличение 7-й хромосомы и уменьшение всей или части 10-й хромосомы, амплификацию *EGFR*, IDH-дикого типа (Louis D.N. et al., 2021). По морфологическим критериям ГБ характеризуются выраженной сосудистой пролиферацией, высокой плотностью клеток на единицу площади, обширными псевдопалисадообразными некрозами, инфильтративным ростом, высокой митотической активностью с наличием большого числа атипичных митозов. Для ГБ характерно наличие фенотипической, геномной нестабильности и гетерогенности, хроническое воспаление с активацией астроглии и микроглии (Li B. et al., 2016; Степаненко А.А. с соавт., 2019). ГБ может прорасти в полость желудочков головного мозга, иметь морфологически “пестрый состав” клеток – гигантские многоядерные, мелкие, гистиоциты, гранулоциты и другие (Louis D.N. et al., 2020).

При диффузных глиомах IDH-дикого типа, встречающихся в более молодых возрастных группах, следует руководствоваться классификацией диффузных глиом детского типа.

Мутация IDH в ГБ у пациентов старше 54 лет редка (<1%), эти случаи можно диагностировать с помощью ИГХ как IDH-дикого типа без секвенирования. Для пациентов молодого возраста ИГХ определения IDH 1 (R132H) недостаточно, необходимо проводить секвенирование, чтобы исключить все неканонические мутации IDH (IDH1 R132C, IDH1 R132G, IDH1 R132S, IDH1 R132L, IDH2) (Mallick S. et al., 2021).

Для ГБ IDH-дикого типа характерны мутации промотора *TERT* (74–83%), что усугубляет прогноз и амплификации *EGFR* (25–50%) (Mallick S. et al., 2021). Также среди наиболее частых активируемых молекулярных изменений в ГБ встречаются потеря PTEN (Phosphatase and tensin homolog), RB1 (retinoblastoma 1), NF1 (Neurofibromatosis type 1), PIK3CA (Phosphatidylinositol 3-kinase), CDK4, MDM2 (Mouse double minute 2 homolog), PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor A), BRCA1-2 (Breast cancer1-2), FGFR1-3 (Fibroblast growth factor receptor 1-3), Мус, JAK (Janus kinase), ROS1 (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase), MET, BRAF V600E (mouse sarcoma viral oncogene v-Raf B homologue V600E). Высокая мутационная нагрузка в опухоли, определяемая как ≥ 10 мутаций на мегабазу, наблюдается только в 4 % случаев ГБ. Частота изменения EGFR,

RB1, PIK3CA статистически значимо увеличивается в образцах ГБ, рецидивирующей относительно недавно диагностированной (Padovan M. et al., 2022). Мутация ATRX с потерей ядерной экспрессии белка, обнаруживаемая ИГХ, редка в данном подтипе опухоли. Частота мутации TP53 тоже относительно низкая (25–37% случаев) (Mallick S. et al., 2021). На онкогенез ГБ также влияет эпигенетическая дисрегуляция онкогенов, и генов супрессоров, ангиогенеза, сигналов пролиферации, клеточной гибели, инвазии и метастазирования, клеточной энергетики, неограниченный потенциал репликации, иммунный надзор, мутации и геномная нестабильность, опухоль-ассоциированное воспаление (Senga Sasi S. et al., 2021). Потеря гетерозиготности (LOH) хромосомы 10 является наиболее частой генной aberrацией при ГБ.

В литературе также описан редкий гистологический подтип – мелкоклеточная ГБ, чаще IDH-дикого типа, в 40-98% случаев с амплификацией *EGFR* (Yadav A.K. et al., 2020). Клетки опухоли иммунопозитивны на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), который экспрессируется в астроцитах, шванновских клетках и клетках энтеральной глиии (Yang Z. et al., 2015), хотя сообщалось и о *GFAP* (Glial fibrillary acidic protein) негативном варианте ГБ (Kato K. et al. 1999; Yadav A.K. et al., 2020). Клетки этой опухоли с атипичными митозами, 30-60% клеток позитивны по Ki67. Несмотря на морфологическое сходство клеток с олигодендроглиомой (IDH-мутант), мелкоклеточная ГБ имеет дикого типа IDH. Как и олигодендроглиомы эти опухоли имеют склонность к обширному поражению коры головного мозга. Иммунофенотип клеток ГБ дикого типа S100 (calcium-binding protein) и нектин негативный с мутацией p53. Наличие некрозов и пролиферация микрососудов не является существенным для постановки диагноза мелкоклеточной ГБ. Она является более агрессивным подтипом, встречается редко и стандарты ее лечения отсутствуют.

Для клеток гигантоклеточной ГБ с дефицитом репарации несоответствия (MMRd-MMR (DNA mismatch repair) deficiency, дефицит системы репарации неспаренных оснований) характерна высокая мутационная нагрузка, в 50% случаев она характеризуется высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H), такие опухоли могут быть чувствительными к иммунотерапии, но устойчивыми к темозоломиду (Kim H. et al., 2022).

Таким образом, в настоящее время рекомендации по лечению опухолей зависят не столько от гистологической характеристики опухоли, сколько от молекулярно-

генетических, эпигенетических aberrаций (Weller M. et al., 2019; Рыжова М.В. с соавт., 2022).

На сегодняшний день, согласно пятой классификации ВОЗ 2021, опухоли ЦНС – это группа гетерогенных заболеваний с различными молекулярно-генетическими, эпигенетическими и морфологическими характеристиками, определяемыми методами секвенирования нового поколения, гибридизации *in situ* профиля экспрессии генов и применением ИГХ маркеров (Pati S. et al., 2020).

1.4 Лечение пациентов с диффузными глиомами взрослого типа, 4 степени ВОЗ

1.4.1 Стандарт лечения пациентов с глиобластомой и астроцитомой

Современный онкологический стандарт (NCCN, версия 2.2022) терапии пациентов с диффузными глиомами взрослого типа 4-й степени включает такие методы как: хирургический, радио- и химиотерапию темозоломидом, терапию переменным электрическим током (Mallick S. et al., 2021), лазерную интерстициальную термотерапию, таргетную терапию. В стандарте также рекомендуется лечение пациентов в клинических испытаниях новых перспективных противоопухолевых методов и ЛВ. Несмотря на прилагаемые усилия на сегодняшний день эффективных способов терапии пациентов с ГБ не существует (Gallego O., 2015). Без лечения медианная продолжительность жизни больных с ГБ обычно составляет 3 месяца, после радиотерапии – 9 месяцев (Scharifa A.H., 2007), после удаления опухоли и последующей лучевой терапии – 12-15 месяцев (Бажанов С.П.2010). Тотальная резекция ГБ независимо от молекулярного статуса опухоли увеличивает продолжительность жизни пациентов (Molinaro A.M. et al., 2020). Лечение ГБ затруднено из-за врожденной или приобретенной устойчивости опухолевых клеток ГБ к известным методам терапии, которые, в свою очередь, оказывают на организм токсический эффект (Lawson H.C. et al., 2007). После проведенного лечения ГБ, как правило, рецидивирует. Согласно стандарту NCCN, версии 2.2022, варианты лечения рецидива включают: проведение лечения пациентов в рамках клинических исследований новых стратегий терапии или резекции опухоли, радио-/химиотерапии, терапии переменным электрическим полем, таргетной терапии. При ХТ препаратом первой линии рекомендовано использование алкилирующего вещества – темозоломида. Системная терапия может также проводиться препаратами платины – цисплатином или карбоплатином, этопозидом – ингибитором Топо II, алкилирующими веществами –

кармустином, ломустином, прокарбозином, цитотоксическим алкалоидом растительного происхождения – винкристином. Стандарт лечения включает таргетную терапию ингибиторами, если в опухоли обнаружены изменения в нейротрофической рецепторной тирозинкиназе NTRK (Neurotrophic tyrosine receptor kinase) и протоонкогене *BRAF*, которые способствуют пролиферации и выживанию клеток опухоли. Таргетная терапия, также как и ХТ, вызывает токсические эффекты и даже может способствовать росту опухоли (Lacouture M. et al., 2018). Лазерная интерстициальная термотерапия – минимально инвазивный хирургический вариант лечения рецидивирующих опухолей ЦНС, несмотря на стандартную терапию опухолей с глубоким расположением в таламусе, гипоталамусе, базальных ганглиях и стволе мозга. Основным принципом лечения заключается в том, что оптоволоконный катетер помещается в опухоль и энергия лазера приводит к повреждению внутриклеточных белков и ДНК с последующей гибелью клеток (NCCN 2.2022).

Несмотря на постепенное улучшение показателей краткосрочной выживаемости, после постановки диагноза длительность жизни у 30% пациентов составляет 2 года, а 5-летняя выживаемость остается относительно постоянной и составляет только 5,8% (Зрелов А.А. с соавт., 2018; Рябова А.И. с соавт., 2018). ХТ при ГБ ограничено эффективна в силу снижающей качество жизни системной токсичности, а также устойчивости клеток опухоли к противоопухолевым препаратам.

Таким образом, лечение пациентов с ГБ на данный момент направлено на паллиативную помощь и терапию, увеличивающую продолжительность жизни. Поэтому поиск новых противоопухолевых ЛВ и методов лечения ГБ продолжается.

1.4.2 Доклинические и клинические исследования новых методов лечения глиобластомы

Иммунотерапия, применяемая при многих опухолевых заболеваниях, дает надежду на ее успешное использование и при ГБ. Вакцины на основе дендритных клеток и лейкоцитов больных ГБ усиливают противоопухолевый иммунный ответ (Datsi A. et al, 2021; Liao LM. et al., 2018). Показан противоопухолевый эффект НЧ PLGA с цитокином IFN γ , ассоциированных с макрофагами, и они тормозили рост ГБ за счет поляризации макрофагов в противовоспалительный M2 фенотип (Shields C.W., et al., 2020).

Терапевтические стратегии опухолевых заболеваний также включают применение блокаторов и агонистов ключевых микроРНК, которые способствуют прогрессии

опухоли. Ингибирование данных молекул может снизить резистентность и повысить чувствительность клеток опухоли к терапии (Shabana A.M., et al., 2021). Применение мультиэпитопной персонализированной неоантигенной вакцины изучается при ГБ, эта опухоль обычно имеют относительно низкую мутационную нагрузку (Lawrence M.S. et al., 2013; Schumacher T.N. et al., 2015) и иммунологически «холодное» микроокружение (Rutledge W.C. et al., 2013). Специфичные неоантигены опухоли, которые образуются в результате мутаций, могут генерировать устойчивый Т-клеточный иммунный ответ (Coulie P.G. et al., 2014; Schumacher T.N. et al., 2015) при ГБ, способствуя гибели опухолевых клеток (Hu Z. Et al., 2018).

Стимуляция адаптивного иммунного ответа с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек PD-1 (programmed cell death protein-1), или PD-L1 (programmed death ligand-1), или CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) за счет активации Т-клеток показала эффективность в лечении меланомы, рака легких, мочевого пузыря и почек, однако при ГБ ожидаемых результатов не принесла (Simonds E.F. et al., 2021).

При стандартной терапии пациентов с ГБ применение ингибиторов интегринов или моноклональных антител против рецепторов эпидермального фактора роста EGFR, которые сверхэкспрессированы в ГБ (Lee A. et al. 2020), статистически значимо не увеличивало выживаемость пациентов. В настоящее время ингибирование мутации *BRAF p.V600E* входит в стандарт лечения пациентов с рецидивирующими глиомами. Доказательства эффективности лечения при ингибировании слияний гена *NTRK* с высокой мутационной нагрузкой у взрослых пациентов с опухолями ЦНС ограничены, aberrаций *FGFR*, *PDGFRA*, *CDK4/6*, *MDM2*, *MDM4* – имели незначительный эффект. Данные по эффективности таргетных препаратов также могут быть ограничены недостаточным количеством исследованных пациентов и необходимостью продолжения клинических испытаний Многие потенциальные мишени в опухоли либо редки, либо не имеют клинического значения, или неясны, или и то, и другое. Сложность и стоимость диагностического анализа, отсутствие доступа к клиническим испытаниям их финансирование препятствуют сбору данных по эффектам таргетной терапии у пациентов с опухолями ЦНС (Capper D. et al., 2023).

Для повышения противоопухолевой эффективности применяют комбинации ЛВ и других методов, а для исключения или снижения системной токсичности перспективно внутриопухолевое введение ЛВ на термо-, рН-, ферментно чувствительных носителях –

гели, полимерные пленки, губки, НЧ, дендримеры (Li Y. et al., 2019; Fana M. et al., 2020; Won H. J et al., 2020).

Методы генной терапии опухолей в доклинических и ранних клинических исследованиях оказались успешны, однако в III фазе клинических испытаний ожидаемый результат данной терапии не оправдался (Galanis E. et al., 2001). Молекулярный «инструмент» (“молекулярные ножницы”) CRISPR/Cas9, применяемый для редактирования генов, можно использовать для поиска и элиминации ключевых фрагментов ДНК, задействованных в туморогенезе (Rosenblum D. et al., 2020).

Для предотвращения лекарственной устойчивости применяют ингибирование аутофагии, которая способствует выживанию опухолевых клеток (Taylor M.A. et al., 2018). В экспериментальной терапии опухолей также применяют онколитические вирусы, которые инфицируют клетки опухоли и вызывают специфический цитотоксический эффект (Stepanenko A.A. et al., 2018; Kamynina M. et al., 2021). Вирусы легко модифицировать, а их способность к горизонтальному переносу генетического материала позволяет использовать их в генной инженерии (Manikandan C. et al., 2020). Экзосомы клеток применяют в качестве систем доставки противоопухолевых веществ – малых некодирующих РНК (Shi-Fu Liang. et al., 2022). Преимущество экзосом состоит в их способности проникать через биологические барьеры, в том числе ГЭБ, и специфично взаимодействовать с клетками опухоли. Состав экзосом близок к составу клеточных мембран за счет сочетания различных липидов, поверхностных и мембранных белков (Herrmann I..K. et al., 2021).

Системы доставки ЛВ, в том числе в составе НЧ, а также их комбинации с иммунотерапией, гипертермией и стандартными методами лечения показали многообещающие результаты в доклинических исследованиях. Считают, что НЧ способны преодолевать ГЭБ с помощью рецепторного и адсорбционно-опосредованного трансцитоза (Seko, I. et al., 2020). Применение специфичных для опухолевых клеток лигандов – антител, а также пептидов или небольших молекулы в составе НЧ с ЛВ может снизить токсические эффекты и увеличить накопление ЛВ в опухоли (Wiwachaitawee K. et al., 2021). Проницаемость ГЭБ при ГБ можно повысить, воздействуя на опухоль сфокусированным ультразвуком (Deng Z et al., 2019).

Лечение переменным электрическим полем, включенное в стандарт лечения ГБ, приводит к смещению субъединиц микротрубочек в митотическом веретене опухолевых

клеток во время перехода от метафазы к анафазе. Происходит диэлектрофоретическое движение внутриклеточных микромолекул и органелл во время телофазы, что препятствует делению клеток. При добавлении данного вида терапии к стандартному лечению пациентов с ГБ общая выживаемость статистически значимо увеличивается и составляет 21 против 16-и месяцев соответственно (Stupp R. et al., 2012).

Гипофракционная радиотерапия может повысить безрецидивную общую выживаемость и снизить токсичность (Trone, J.C. et al, 2020). Облучение ниши стволовых клеток ГБ, расположенной вблизи к субвентрикулярной зоне, может улучшить результат терапии (Mallick S. et al., 2021). Однако опухоль может прогрессировать после воздействия радиоактивного излучения, так как увеличивается продукция растворимой молекулы межклеточной адгезии-1 (sICAM-1), стимулирующей секрецию белка Wnt3A (Proto-oncogene protein), способствующего мезенхимальному сдвигу клеток ГБ. Возможно сочетание лучевой терапии с ингибированием sICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule) повысит эффективность лечения (Yoo K.C. et al., 2022).

Одна из проблем в лечении опухолей ЦНС заключается в доставке противоопухолевых молекул через ГЭБ и гематоопухолевый барьер к клеткам опухоли (Belykh E. et al., 2020). Проводятся исследования эффективности конвекционного метода доставки противоопухолевых веществ в ткани опухоли, который заключается в дозированном введении под положительным давлением ЛВ через специальную канюлю в опухоль (Halle V. et al., 2019). В некоторых случаях ЛВ необходимо вводить непосредственно в спинномозговую жидкость, где оно может попасть в мозг, преодолев ГЭБ (Abdullahi W. et al., 2018).

Одним из методов лечения ГБ может быть использование ингибиторов ферментов биосинтеза глутатиона (бутионин сульфоксимин) или ингибиторов детоксифицирующих ферментов (глутатион-S-трансфераза – фермент, осуществляющий конъюгацию электрофильных молекул и глутатиона), что может снижать количество глутатиона, способствуя лечению пациентов с ГБ (Bansal A. et al., 2018; de los Santos-Jiménez, J. et al., 2021).

Таким образом, в связи с отсутствием эффективных методов лечения ГБ, ведутся исследования поиску новых методов терапии и комбинаций стратегий лечения пациентов с ГБ с учетом молекулярных подтипов опухоли. Проводятся исследования ГЭБ и его

проницаемости для различных ЛВ и их способов их адресной доставки к клеткам опухоли.

1.4.3 Химиотерапия диффузных глиом взрослого типа, 4 степени ВОЗ

ЛВ, которые применяются для системной терапии больных ГБ, должны преодолевать ГЭБ и гематоопухолевый барьеры, накапливаться в терапевтических концентрациях в ткани опухоли, иметь низкий профиль системной токсичности.

ХТ замедляет рост опухоли, которую невозможно удалить с помощью хирургического вмешательства, и облегчает симптомы, вызванные ростом опухоли. ХТ может быть местной: при этом биodeградируемые пластины с кармустином помещают в полость после резекции ГБ, что позволяет противоопухолевому веществу концентрироваться непосредственно в опухоли и избегать системной токсичности. При некоторых опухолях ЦНС препараты можно вводить непосредственно в спинномозговую жидкость позвоночного канала. Обычно ХТ проводится системно, ЛВ разносится с током крови и оказывает токсическое действие на организм, что значительно ухудшает качество жизни пациентов. Одним из основных механизмов действия химиопрепаратов является алкилирование ДНК, кроме того ХТ опосредует противоопухолевое действие за счет метилирования, повреждения ДНК, опосредованное свободными радикалами, и подавление синтеза ДНК и белков (Palko N.N. et al., 2019).

Темодал® (темозоломид) применяемый в терапии злокачественных глиом, был синтезирован в 1984 г. в Великобритании (Stevens M. et al., 1987), он относится к группе алкилирующих агентов 2-го поколения – имидазотетразинов. После приема внутрь он быстро всасывается и поступает в кровь в неизменном виде. Являясь небольшой по размерам липофильной молекулой, при системном введении Темодал® легко проникает через ГЭБ и накапливается в тканях опухоли в концентрациях, достаточных для реализации его противоопухолевой активности. При попадании в организм человека он подвергается спонтанному гидролизу (без участия каких-либо ферментных систем), превращаясь в активный метаболит 3-метил-(триазен-1-ил) имидазол-4-карбозамид, а затем – в реактивный ион метилдиазониум, который повреждает опухолевые клетки за счет наличия в нем метильной группы. Основным механизмом действия Темодала® – метилирование ДНК опухолевых клеток (присоединение метильных групп СН₃ к определенным участкам ДНК), которое в конечном итоге приводит к многочисленным разрывам цепочки ДНК. Клеточная система репарации не способна восстановить эти

разрывы, так как Темодал® подавляет активность ряда ферментов (экзонуклеазы 1, белков репарации ДНК – MSH2, MSH6 (DNA mismatch repair protein) и RAD51 (DNA repair protein RAD51 homolog 1), ответственных за репарацию ДНК (Zhu Y., 2014).

В отдельных случаях при химиотерапии ГБ используются препараты из групп нитрозомочевины – кармустин, ломустин и алкилирующее соединение прокарбазин. Липофильная природа кармустина обеспечивает его легкое проникновение в ЦНС, и он остается основным ЛВ, используемым для лечения злокачественных опухолей головного мозга. Реакционноспособная группа хлорэтилдиазония связывается с ДНК и оказывает цитотоксическое и миелосупрессорное действие. Предполагается, что побочный продукт кармустина, изоцианат, обуславливает его токсическое действие на легкие с развитием фиброза (Aronson J.K., 2016).

Точные механизмы действия прокарбазина неизвестны. Препарат ингибирует синтез белков, ДНК, РНК, нарушая процессы транسمетилирования, способствует образованию перекиси водорода в результате аутооксигенации. Перекись водорода, взаимодействуя с сульфгидрильными группами белков, способствует более плотной спирализации молекулы ДНК и затрудняет процессы транскрипции. Однако резистентность к прокарбазину развивается довольно быстро (Fink D., et al., 1998). В ряде случаев, в связи с быстро развивающейся резистентностью опухолевых клеток, применяют комбинацию химиопрепаратов (например, прокарбазин, ломустин, винкристин) (Радулеску Г.Г., 2003).

Цитотоксическое действие большинства противоопухолевых препаратов, независимо от конкретного механизма их действия, реализуется путем индукции апоптоза. Эффект осуществляется посредством нарушения регуляции генов, участвующих в промотировании или ингибировании проапоптотической программы. Наиболее изучен вклад в формирование лекарственной резистентности протоонкогенов c-Myc, Ras (Rat sarcoma virus) и Src (non-receptor tyrosine kinase), сверхэкспрессии генов семейства Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) и нарушения функциональной активности онкосупрессора p53 (Si, W. et al., 2019). Повышение количества опухолевых клеток с морфологическими признаками гибели может являться характеристикой регрессии опухолевого процесса и показателем эффективности тестируемого противоопухолевого препарата.

Для снижения токсических эффектов ХТ применяют глюкокортикоиды, которые, в свою очередь, в больших дозах или при длительном курсовом применении усиливают диссеминацию, подвижность и резистентность к ЛВ опухолевых клеток (Maurice-Dror C. et al., 2018).

Таким образом, согласно стандарту лечения NCCN, при системной ХТ больных, как с первичной ГБ, так и при рецидиве, применяют алкилирующий агент темазоломид, как основное противоопухолевое ЛВ. Эффективность темазоломида выше, если в клетках ГБ есть метилирование промотора MGMT (O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase) – фермента, участвующего в репарации ДНК. При возникновении устойчивости к темазоломиду или отсутствия метилирования промотора MGMT применяют комбинации препаратов прокарбозина, винкристина, кармустина. Также местно, в ложе после резекции ГБ помещают полимерные пластинки с алкилирующим агентом ломустином (Weller M, 2020). Благодаря современному стандарту лечения, улучшилась краткосрочная выживаемость пациентов с ГБ, однако долгосрочная остается неудовлетворительной, поэтому ведется поиск более эффективных методов лечения.

1.5 Доксорубин в терапии опухолей

Противоопухолевый антибиотик Докс (рис. 1) оказывает антимитотическое и антипролиферативное действие, он ранее не использовался для лечения злокачественных опухолей мозга, поскольку многие исследователи полагают, что, будучи субстратом Р-гликопротеина, Докс не проникает через ГЭБ при системном введении (Deng Z, et al., 2019). Тем не менее, Докс применяется при таких онкологических заболеваниях как саркома мягких тканей, опухоли молочной железы, щитовидной железы, пищевода, желудка, мелкоклеточный рак легких, гепатобластома, нейробластома, острый миелобластный лейкоз (Hinkley J.M. et al., 2019). Докс подавляет синтез ДНК и РНК, обладает высокой противоопухолевой активностью при низкой избирательности действия (Brayfield A., 2014). В то же время ряд фактов свидетельствует о том, что Докс может быть эффективен при лечении пациентов с ГБ. Еще в 1999 году было показано, что цитотоксическая активность Докс в отношении клеток глиомы превышает активность кармустина (Stan A.C. et al., 1999). Внутриопухолевое введение Докс приводит к увеличению продолжительности жизни больных с ГБ (Walter K.A. et al., 1995; Matcovschi V. et al., 2019). Докс обычно вводят внутривенно в дозах от 60 до 75 мг на квадратный

метр площади поверхности тела каждые 21-28 дней. Доза зависит от показаний, площади поверхности тела и функции печени (Hinkley J.M. et al., 2019).

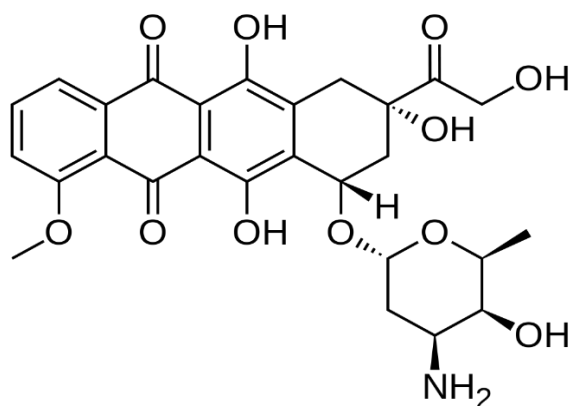


Рисунок 1. Химическая структура доксорубицина

1.5.1 Химическая природа доксорубицина

Антрациклиновый антибиотик Докс был выделен из бактерий *Streptomyces peucetius varietal caesioides* (Олсуфьева Е. Н., 1990; Al-Malky H. S. et al., 2020). Докс – полусинтетическое производное даунорубицина. Название «антрациклины» было введено Х. Брокманном, который описал входящий в структуру агликон – 7,8,9,10 тетрагидро-5,12-нафтаценхинон. Агликон состоит из тетрациклического ядра, в которое входит хиноновое, гидрохиноновое, гидроароматическое и ароматическое кольца (рис. 1). Активной частью молекулы Докс является хиноновое кольцо (Олсуфьева Е. Н., 1990}. Аминосахар, называемый даунозамином, связан гликозидной связью с тетрациклиновой частью молекулы и состоит из 3-амино-2,3,6-тридезоксид-*L*-фукозильной части. Растворимость Докс обеспечивает остаток сахара в молекуле антибиотика (Олсуфьева Е. Н., 1993). Все антибиотики антрациклинового ряда обладают разнообразными биологическими эффектами: антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий, цитотоксическим и противоопухолевым действием.

1.5.2 Механизмы действия доксорубицина

Классическим механизмом действия антрациклинов является *ингибирование топоизомеразы II* (Торо II) (рис. 2). Этот фермент играет ключевую роль в конденсации хромосом, декатенации переплетенных цепей ДНК и ослаблении натяжения ДНК перед репликационной вилкой. Это приводит к формированию временного двуцепочечного разрыва в одной цепи ДНК, позволяя реплицироваться другой цепи ДНК,

а затем закрывает начальный разрыв путем повторного лигирования концов ДНК (Delgado J. L. et al., 2018; van der Zanden S. Y., 2021).

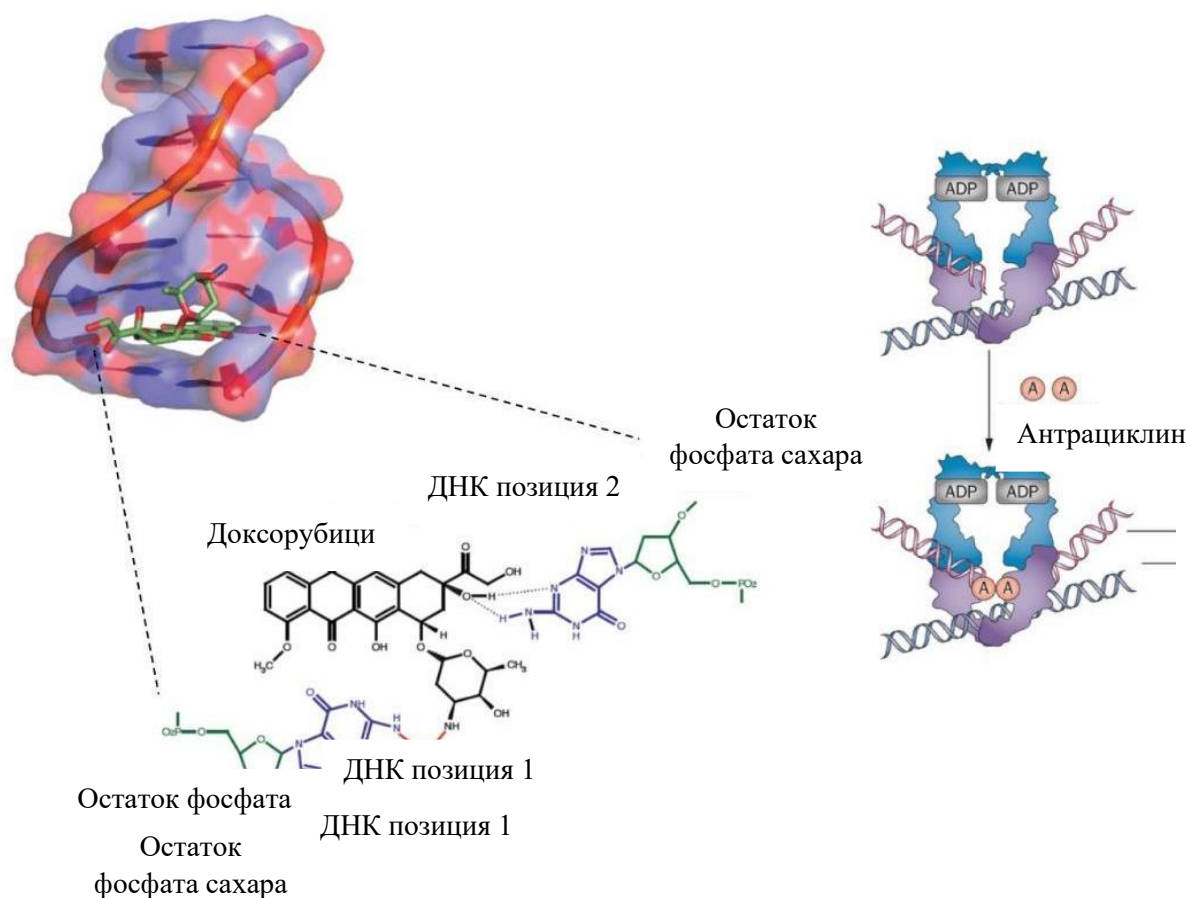


Рисунок 2. Интеркаляция молекул доксорубицина между цепями ДНК и ингибирование топоизомеразы (van der Zanden S. Y., 2021)

Интеркаляция в ДНК происходит после индукции начального разрыва путем образования комплексов Торо II – ДНК. Молекулы Докс препятствуют взаимодействию Торо II – ДНК с их углеводным фрагментами и циклогексановым кольцом (van der Zanden S. Y., 2021), тем самым предотвращая повторное лигирование разорванной цепи ДНК, вызывая ее ферментно-опосредованное повреждение (Jawad B. et al., 2019). В ответ на образовавшийся разрыв ДНК клеточный цикл останавливается, и клетка погибает. Торо II необходим для выживания быстро делящихся опухолевых клеток, которые более чувствительны к разрывам ДНК, чем нормальные покоящиеся клетки. Поэтому антрациклины, с одной стороны, создают химиотерапевтическое окно, блокируя фермент

– Торо II в клетках, а с другой, при действии на нормальные клетки вызывают побочные токсические эффекты (Van der Zanden S. Y., 2021).

Повреждение хроматина – один из механизмов противоопухолевого действия Докс. Конкурируя за связывание с гистонами хроматина, Докс вытесняет их (Qiao X. et al., 2020; van der Zanden S. Y., 2021). Гистоны напрямую участвуют в регуляции процессов сборки, пространственной организации и компактизации хроматина путем влияния через гистон-модифицирующие ферменты и АТФ-ремоделирующие комплексы. После замещения гистонов уменьшается количество эпигенетических меток (Qiao X. et al., 2020).

Докс удаляет гистоны в открытых геномных областях, маркированных эпигенетической модификацией H3K36me3 гистона H3. Также он вызывает диссоциацию нуклеосом, что показано в экспериментах *in vitro* с реконструированными одиночными нуклеосомами (van der Zanden S. Y., 2021). Показано, что метаболит Докс – доксорубицинон, в котором отсутствует углеводная составляющая, не может диссоциировать нуклеосомы, что говорит о решающем вкладе в повреждение хроматина именно молекулы углевода (Delgado J. L. et al., 2018).

В настоящее время считается, что вытеснение гистонов из хроматина происходит с помощью антрахиноновой группы Докс (интеркаляция ДНК), а дестабилизация нуклеосом происходит в результате взаимодействия с углеводным фрагментом молекулы (Delgado J. L. et al., 2018).

Окислительный стресс – один из механизмов действия Докс. Токсическое действие Докс связано с образованием АФК (рис. 3) и прямым воздействием на мембраны клеток. В митохондриях с помощью ряда оксидоредуктаз: цитохром P450 редуктазы, ксантиноксидазы и НАДН-дегидрогеназы, за счет одноэлектронного восстановления хиноновго кольца Докс преобразуется в семихинон. В последующем, образовавшийся семихиноновый радикал отдает один электрон молекулярному кислороду, восстанавливая его до супероксид-анион-радикала, в то время как семихиноновый радикал окисляется до исходной молекулы хинона (рис. 3). В результате описанного процесса (редокс-цикл) образуется большое количество АФК, которые оказывают повреждающее действие на клетки опухоли и клетки органов-мишеней (Zhu H. et al., 2016).

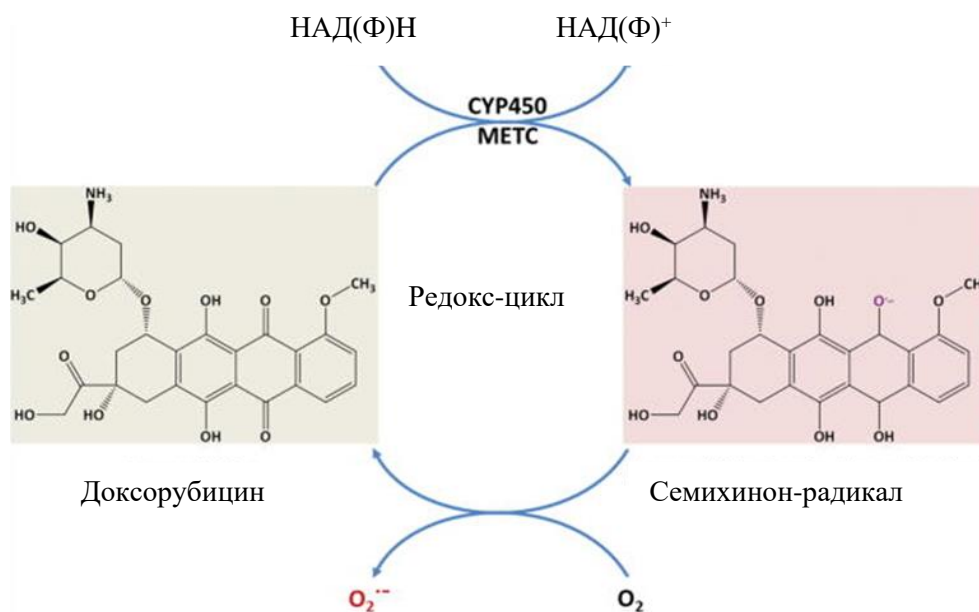


Рисунок 3. Схема окислительно-восстановительного цикла доксорубина с ферментом цитохром Р450 (СУР450) и митохондриальной электронной транспортной цепью (Zhu H. et al., 2016)

Кроме того, Докс может приводить к продукции АФК, воздействуя на пути метаболизма железа. Показано, что в клетках печени Докс взаимодействует с регуляторными белками IRP1 и IRP2 (Iron-responsive element-binding protein – железочувствительный элемент-связывающий белок) митохондрий и способствует высвобождению железа из ферритина (Smuder A. J., 2019).

Образовавшиеся под воздействием Докс АФК вызывают окисление липидов, повреждение геномной и митохондриальной ДНК (Zhu H. et al., 2016; Wallace K. B., 2020). Однако роль АФК в противоопухолевой активности антрациклинов до сих пор активно обсуждается. Стоит отметить, что чрезмерное образование АФК наблюдается в том случае, когда клетки подвергаются воздействию Докс в дозах, намного превышающих терапевтические. Тогда как в терапевтических дозах Докс вызывает образование АФК только в позднем периоде после отмены препарата, что свидетельствует о непрямом механизме повреждения (Wallace K. B., 2020).

Таким образом, химиотерапевтическое действие Докс связано со следующими механизмами: ингибирование топоизомеразы, нарушение структуры хроматина, образование АФК. Эти же механизмы обуславливают и токсическое действие Докс.

1.6 Токсические эффекты доксорубина при химиотерапии опухолей

Экстраполирование данных, полученных в доклинических исследованиях на животных, в дальнейшие клинические испытания является одной из проблем медицины. Для подбора эквивалентных доз для изучения токсических и фармакологических эффектов применяют межвидовой перенос доз с применением коэффициента, учитывающего разницу в площади поверхности тела. Возможен также прямой перенос доз в пересчете на единицу массы тела, и данные фармакокинетических исследований. Однако универсального подхода для межвидовой трансляции доз не существует, необходимо учитывать особенности химической структуры ЛВ, способ введения, фармакокинетику, данные доклинического и клинического изучения фармакодинамики, наличие межвидовых особенностей фармакокинетики и фармакодинамики (Шекунова Е.В. с соавт., 2020).

Клиническое применение Докс при его системном введении имеет ограничение из-за отсутствия опухолевой специфичности препарата и развития тяжелой полиорганной токсичности. При лечении пациентов с онкологическими заболеваниями Докс обычно вводят внутривенно в терапевтических дозах от 60 до 75 мг/м² площади поверхности тела каждые 21-28 дней. Дозировка варьирует в зависимости от клинических показаний, площади поверхности тела и функционального состояния печени (LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, 2012). Согласно литературным данным при экспериментальной противоопухолевой терапии применяли Докс для мышей (Bagalkot V. et al., 2009; McCarthy M., 2014) и крыс в дозе 5 мг/кг (Инчина В.И. с соавт., 2020; Балыкова Л. А. с соавт., 2021). Общие побочные эффекты Докс включают подавление костномозгового кроветворения с развитием анемии и миелосупрессии, тошноту, рвоту, диарею, головную боль, головокружение, спутанность сознания, невропатию, алопецию, кожную сыпь и лихорадку. Высокие дозы или длительная терапия Докс могут вызвать выраженную миелосупрессию, сердечную, печеночную и почечную токсичность, которые являются основными побочными эффектами, ограничивающим его терапевтическую дозу. Длительное клиническое наблюдение пациентов, пролеченных Докс, показывают, что у них могут возникать другие злокачественные новообразования, особенно, в ответ на высокие суммарные накопленные дозы Докс (Ratain M.J. et al., 1992).

1.6.1 Кардиотоксические эффекты доксорубицина при химиотерапии опухолей

Кардиотоксичность, индуцированная антрациклинами, впервые была зарегистрирована более четырех десятилетий назад во время ранней клинической противоопухолевой оценки эффективности Докс. При патоморфологическом исследовании обнаружена гибель кардиомиоцитов, их дегенеративные изменения, снижение содержания в них актина и миозина, набухание митохондрий и появление внутримитохондриальных плотных включений. Застойная сердечная недостаточность возникала у 0,27% пациентов, которые получали менее 550 мг/м² Докс и у 30% пациентов, которым вводили более 550 мг/м² (Олсуфьева Е. Н., 1992). В крупномасштабном исследовании с ретроспективной оценкой кардиотоксичности Докс, было показано, что застойная сердечная недостаточность развивается примерно у 26% пациентов при суммарной дозе Докс 550 мг/м², а у пожилых пациентов – при более низкой суммарной дозе (Lefrak EA et al., 1973).

Ключевыми механизмами токсичности Докс являются увеличение АФК и ингибирование Топо II b, что приводит к повреждению кардиомиоцитов (Al-Malky H. S. et al., 2020). Авторы обнаружили ассоциацию токсичности Докс с полиморфизмами NAD(P)H-оксидазы и эффлюксных транспортеров Докс. Хроническая сердечная недостаточность, вызванная Докс, была связана с наличием у пациента варианта субъединицы NAD(P)H оксидазы. Острая сердечная недостаточность была ассоциирована с полиморфизмом HIS72TYR в субъединице p22rhox и с вариантом 7508T-> A субъединицы RAC2 NAD(P)H оксидазы. Мыши с дефицитом активности NAD(P)H-оксидазы, в отличие от мышей дикого типа, были устойчивы к курсовым введениям Докс (Wojnowski L. et al., 2005). Острая сердечная недостаточность чаще наблюдалась при варианте Gly671Val белка 1 множественной лекарственной устойчивости и с гаплотипом Val1188Glu-Cys1515Tyr (Wojnowski L. et al., 2005).

Острая сердечная патология выявлена у 3,2% пациентов, получавших антрациклины (Bhagat A. et al., 2020), и она возникает в течение нескольких недель после начала терапии. По клиническим данным у пациентов при химиотерапии Докс в течение жизни была зарегистрирована токсичность препарата, проявляющаяся нарушением систолической функции левого желудочка (Rawat P. S. et al., 2021). При аутопсии у 31% пациентов морфологические признаки токсичности отсутствовали. У остальных 69% пациентов были выявлены клинические и морфологические признаки токсичности Докс,

которые варьировали по тяжести. У 48 из 69% не было морфологических проявлений кардиотоксичности, однако у 52% пациентов с клинической картиной токсичности Докс, тем не менее, при морфологическом исследовании были выявлены повреждения миокарда – от умеренных у большинства пациентов, до обширных. Признаки выраженной токсичности по морфологическим данным были связаны с большими дозами – более 450 мг/м^2 Докс. Следует отметить, что последствия кардиотоксичности более выражены при облучении средостения, применяемом в комплексном лечении и у пациентов старше 70 лет. Клинические признаки токсичности могут наблюдаться и при отсутствии структурных изменений в миокарде. Аналогично, при отсутствии клинических проявлений токсичности Докс, определяются ее морфологические признаки (Bray F. et al., 2018; Delgado J. L. et al., 2018). Патология сердца характеризуется снижением фракции выброса левого желудочка у 20 % пациентов не только вовремя, но и после завершения курса химиотерапии (Djabir Y. Y. et al., 2017). ХТ онкологических больных высокими дозами Докс ограничена из-за токсичности препарата. Так у пациентов с положительным тестом на тропонин I была обнаружена тесная взаимосвязь между кратковременным его увеличением и наибольшим снижением фракции выброса левого желудочка сердца (Dragojevic S. et al., 2019). Риск развития сердечной недостаточности у пациентов, получавших общую дозу Докс 400 мг/м^2 , составлял 5%, и увеличивался до 25% при дозе 700 мг/м^2 (Gianni L. et al., 2008).

Поздние осложнения ХТ проявляются тяжелой сердечной недостаточностью, которая развивается в период от нескольких месяцев до нескольких лет (чаще всего в течение 3 месяцев) после терапии антрациклином (El-Sayed E. S. M., 2017; Essa D. et al., 2020). Однако симптомы сердечной недостаточности могут возникать и в более поздние сроки, даже через десять лет после лечения. Кардиотоксичность Докс представляет серьезную клиническую проблему, особенно среди тех пациентов, которые пережили лечение злокачественных новообразований антрациклинами в детстве (El-Sayed E. S. M., 2017). При хронической кардиомиопатии может наблюдаться бессимптомная диастолическая или систолическая дисфункции, которая часто приводит к сердечной недостаточности. Частота сердечной дисфункции напрямую связана с суммарной дозой антрациклинов, но она также может возникать и при низких дозах препарата (Fujiwara A. et al., 2008). Факторы риска развития сердечной дисфункции включают пожилой или детский возраст, одновременное применение других кардиотоксических

противоопухолевых средств (таких как трастузумаб), лучевая терапия области грудной клетки и развившиеся до проведения ХТ сердечно-сосудистые заболевания. Осведомленность об этих рисках сердечной дисфункции может привести к раннему выявлению и лечению сердечной недостаточности (Fukasawa H. et al., 2014).

Применение более высоких суммарных доз Докс может быть достигнуто инкапсуляцией Докс в липосомы и характеризуется низкой частотой развития сердечной недостаточности и повреждения миокарда при терапии опухолей по сравнению со стандартной формой Докс (Gianni L. et al., 2008). Несмотря на меньшую кардиотоксичность липосомального Докс по сравнению с Докс, FDA рекомендует регулярное наблюдение за снижением фракции выброса левого желудочка при использовании липосомального Докс. Для снижения кардиотоксичности Докс применяют дексразоксан, который представляет собой хелатор, подобный этилендиаминтетрауксусной кислоте, связывающий железо и защищающий кардиомиоциты от токсического воздействия Докс (Jawad B. et al., 2019). Кардио- и нефропротекторная (Hu H. et al., 2022) эффективность дексразоксана при применении с Докс была подтверждена клинически, однако возникли некоторые опасения по поводу более низкой частоты ответа на ХТ и развития вторичной лейкемии у детей, перенесших онкологическое заболевание (Said R. et al., 2017; Kendal B. et al., 2020). Для снижения кардиотоксичности Докс при проведении ХТ применяют антиоксиданты, что может повысить активность глутатиона, супероксиддисмутазы, каталазы и привести к снижению АФК (Bhagat A. et al., 2020). Однако, сочетание ХТ и антиоксидантов может способствовать прогрессии опухоли (Mendelsohn A.R. et al., 2014). Гены-супрессоры опухолей, такие как *Nrf2* (The nuclear factor erythroid 2-related factor 2), стимулируют врожденные пути клеточной защиты от стресса, снижают АФК, что способствует прогрессированию опухоли и обеспечивает защиту от ХТ (Mendelsohn A.R. et al., 2014). Антиоксиданты также ингибируют ферроптоз – одну из разновидностей клеточной гибели, что также может способствовать росту опухоли (Kajarabille N. et al., 2019).

1.6.2 Гепатотоксические эффекты доксорубицина при химиотерапии опухолей

Докс широко используется для лечения злокачественных новообразований, но его клиническое применение ограничено из-за гепатотоксичности. Печень играет ключевую роль в метаболизме и выведении Докс. Препарат накапливается в тканях печени, 50%

Докс остается неизменным и выводится с желчью. Другая часть Докс метаболизируется в печени путем двухэлектродного восстановления до метаболита доксорубинола, этому процессу способствует карбонилредуктаза 1. Детоксикация реактивных метаболитов Докс может происходить через микросомальные редуктазы печени с образованием дезоксигликонов (Prasanna P. L., et al., 2020). При химиотерапии Докс у онкологических больных патоморфологические изменения в тканях печени включают дистрофические изменения гепатоцитов, гиперплазию желчных протоков, очаговый некроз, повреждение сосудов (Pugazhendhi A. et al., 2018), тромбоз центральной вены и фиброз (Gotama K. T. et al., 2019). Также свидетельствуют о токсичности Докс для тканей печени повышение в сыворотке крови уровней активности АЛТ и АСТ, ЛДГ, прямого и общего билирубина (Prasanna P. L. et al., 2020), провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β (Cengiz O. et al., 2021), малонового диальдегида, снижение уровней ЛПВП и альбумина (Mansouri E. et al., 2017). Повышается уровень индуцирующих окислительный стресс АФК, характеризующиеся увеличением экспрессии *Nrf2*, FOXO1 (Forkhead box protein O1) и HO-1 (heme oxygenase-1), и снижением активности ферментов антиоксидантной защиты (Akhigbe R.E. et al., 2021). Окислительный стресс усиливает апоптоз.

Показано, что Докс в диапазоне терапевтических доз 0,75 - 0,1 мг/кг и его липосомальная форма в дозе 0,1 мг/кг, усиливают окислительный стресс, гепатотоксичность и генотоксичность *in vivo* у крыс (Shokrzadeh M. et al., 2021).

Некоторые вещества, такие как экстракты лекарственных растений *Boswellia serrata* (Barakat, Bassant M., et al., 2018) и многие другие – правастатин (Mansouri E. et al., 2017), метформин (Alhowail A. et al., 2019), селен (Cengiz O. et al., 2021), физические упражнения (Santos-Alves E. et al., 2019) могут снижать гепатотоксические эффекты Докс, за счет снижения окислительного стресса и воспаления (Prasanna P. L. et al., 2020).

1.6.3 Нефротоксический эффект доксорубина при химиотерапии опухолей

В 1977 году впервые было показано, что при терапии опухолей Докс развивается почечная недостаточность (Smuder A. J., 2019). Установлено, что метаболит Докс – доксорубинол накапливается в почках, выведение его с мочой составляет примерно 4–5% от введенной дозы в течение нескольких дней (Fukasawa H. et al., 2014; Smuder A. J., 2019).

Выраженный нефротоксический эффект наблюдается при введении Докс крысам в дозе 3,75 мг/кг/неделю, внутрибрюшинно, при общей суммарной дозе 15 мг/кг (Soltani Nekmat A. et al., 2021). При моделировании нефротоксичности, вызванной Докс у грызунов, показано, что он вызывает повреждение почечных клубочков и канальцев почек (Grant M.K.O. et al., 2019) с развитием фиброза (Xiang. C. et al., 2021), первичного фокального сегментарного гломерулосклероза, тубулоинтерстициального воспаления, а также отложений мочевой кислоты в почечных канальцах (Afsar T. et al., 2020; Mostafa R.E. et al., 2021). Считается, что превращение Докс в форму семихинона влияет на нефротоксичность. Семихинон в аэробных условиях нестабилен и вступает в реакцию с молекулярным кислородом с образованием супероксидных анионных радикалов (Zhu H. et al., 2016). По мере увеличения количества АФК инфильтрирующие нейтрофилы и мезенхимальные клетки клубочков почек генерируют еще больше свободных радикалов, которые повреждают ткани почек (Skopelja-Gardner S., et al., 2021). Докс оказывает прямое токсическое действие на подоциты и эндотелиальные клетки клубочков с развитием интерстициального воспаления и фиброза (Zhu M.M. et al., 2019). При повреждении почек Докс нарушается их выделительная функция – в сыворотке крови снижается концентрация альбумина, повышается содержание креатинина и мочевины, а также оксида азота и провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 β , ФНО- α , ФРО- β и ИЛ-6 (Demir F. et al., 2020). Отмечается также снижение активности ферментов антиоксидантной защиты (Soltani Nekmat A. et al., 2021), увеличивается содержание малонового диальдегида и АФК, активизируется фосфорилирование I κ B α (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha), I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) и NF- κ B, p65 (Transcription factor), циклооксигеназы-2, p21 (a potent cyclin-dependent kinase inhibitor) и p53 в тканях почек (Zhu M.M. et al., 2019). Докс способствует старению клеток почек, что приводит к увеличению экспрессии 8-OHdG (8-Oxo-2'-deoxyguanosine), индуцируемой синтазы оксида азота, регулятора апоптоза Bax (Bcl-2-associated X protein) (Mostafa R.E. et al., 2021) и активируются процессы, связанные с апоптозом, повреждением ДНК (Xiang. C. et al., 2021), пироптозом (Shen X. et al., 2021) и др.

По данным E.S. El-Sayed и соавт. (2017) при моделировании острой нефротоксичности на пятый день после однократного внутрибрюшинного введения Докс в дозе 25 мг/кг у самцов крыс Вистар наблюдался отек и разрушение эпителия канальцев

почки, дисфункция митохондрий (Kubat G.V. et al., 2021), а в сыворотке крови увеличивалось содержание мочевины и креатинина (Sanajou D., et al., 2019), развивалось воспаление и окислительное повреждение подоцитов (Zhu M.M. et al., 2019). При острой нефротоксичности вызванной Докс (7,5 мг/кг, в/в) наблюдалось увеличение массы почек, обнаружены тромбы в кровеносных сосудах и очаговые кровоизлияния в строме почек (Asaad G.F. et al., 2021). При острой нефротоксичности, вызванной Докс (40 мг/кг массы тела, в/в), повышались уровни мочевины, АСТ, АЛТ и ЛДГ и креатинина, холестерина, кальция и натрия, снижались уровни ферментов антиоксидантной защиты (Benzer F. et al., 2018). Почечные концентрации аскорбиновой кислоты, хлорида, магния и калия, а также почечная активность каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, Ca²⁺-АТФазы, Mg²⁺-АТФазы и Na⁺, K⁺-АТФазы были значительно снижены на фоне острой нефротоксичности индуцированной разовым внутрибрюшинным введением 15 мг/кг доксорубина (Ikewuchi C.C. et al., 2021).

Установлено, что ЛД₅₀ Докс в НЧ из неионогенных ПАВ и холестерина составляла 5,5±0,7 у крыс и 4,0±0,6 мг/кг у мышей обоего пола. У животных, которым вводили обычную форму Докс, этот показатель был выше – 14,2±1,2 и 10,8±1,0 мг/кг соответственно. Таким образом, показано повышение биодоступности Докс и возникновении летальной токсичности при применении гораздо меньшей дозы антибиотика при его заключении в ниосомы (Базиков И. А. с соавт., 2015). При применении липосомальной формы Докс (5 мг/кг, в/в) по сравнению с его обычной формой показано снижение показателей летальности у крыс, что обусловлено его меньшей токсичностью за счет изоляции Докс в липосомах (Инчина В.И. с соавт., 2020). Также при применении липосомальной формы Докс отмечался и противоопухолевый эффект – снижался объем опухоли, количество метастазов по сравнению с его обычной формой, при этом токсические эффекты были ниже (Балыкова Л.А. с соавт., 2021).

1.6.4 Токсические эффекты доксорубина на головной мозг при химиотерапии опухолей

Показано, что когнитивные нарушения, вызванные ХТ, возникает у 30-70% онкологических пациентов и после прекращения ХТ они длительно сохраняются. Механизмы когнитивных нарушений, вызванных Докс, не ясны, поскольку считается, что белки множественной лекарственной устойчивости препятствует проникновению Докс

через неповрежденный ГЭБ (Ongnok V. et al., 2019). Докс повышает продукцию свободных радикалов, окисляя в крови АроА1, что повышает продукцию ФНО- α макрофагами и моноцитами и крови (Kaczmarek A. et al., 2013). ФНО- α из кровотока проникает через ГЭБ, вызывает оксидативный стресс, а также образование активных форм азота в клетках головного мозга, а также стимулирует продукцию ФНО- α глиальными клетками (Joshi et al., 2010). ФНО- α , продуцируемый клетками крови и ЦНС, оказывает токсическое действие и вызывает апоптоз нейронов головного мозга, что приводит к изменениям поведения (Aluise et al., 2011; Keeney et al., 2013; Баттерфилд, 2014). Окислительный и нитрозирующий стресс, а также воспаление, которые вызывают ХТ препараты, также могут влиять на их распределение в головном мозге, поскольку многие ХТ препараты также являются субстратами эффлюксных белков-транспортеров (Banks W.A. et al. 2021). Например, было показано, что Докс увеличивает экспрессию эффлюксного белка MDRP-1 (Multidrug Resistance Protein-1) в головном мозге грызунов (Mercier C. et al., 2003). Изучение взаимосвязей системного и нейровоспаления, связанного с ХТ, и последующего воздействия на регуляцию белков множественной лекарственной устойчивости в ГЭБ является важной проблемой для терапии опухолей головного мозга. (Erickson M.A. et al., 2018).

Таким образом, возможности традиционной химиотерапии ГЭБ ограничены из-за резистентности опухоли к ЛВ и их токсичности. Докс вызывает тяжелые побочные эффекты, особенно миелосупрессию, которая может привести к тяжелой нейтропении и сепсису. Поэтому ведется поиск методов, снижающих его токсические эффекты. Однако следует учитывать, что введение ингибиторов, направленных на основные механизмы действия Докс, в том числе антиоксиданты, кардио-, гепато- и нефропротекторные вещества не должно снижать противоопухолевый эффект ХТ препарата. Для обеспечения целенаправленного действия на ткани опухоли и снижения системной токсичности Докс разрабатываются различные средства доставки – полимерные пленки, частицы, гели, липосомы, в том числе термо-, рН- и ферменточувствительные, с иммобилизацией на их поверхностях биологически активных молекул (Ewend M.G. et al., 2007; Zhang Y. et al. 2020; NCT04751786; NCT04619056).

1.7 Гематоэнцефалический барьер и проблема доставки лекарственных веществ в мозг

ГЭБ имеется в капиллярах большинства областей головного мозга, но не во всех. Через ГЭБ активно транспортируется кислород, биоактивные и питательные вещества (Ohtsuki S., 2004), а с помощью лимфатической системы и сети менингеальных лимфатических сосудов, которые специфически связаны с глубокими шейными лимфатическими узлами, продукты жизнедеятельности выводятся из нервной ткани (Jessen N.A. et al., 2015). На структурном уровне ГЭБ состоит из эндотелиальных клеток, соединенных между собой плотными контактами и покрытых гликокаликсом с внешней стороны мембраны, а также перицитов, астроцитов и элементов внеклеточного матрикса. Базальные мембраны эндотелия, концевые ножки астроцитов и перицитов связаны между собой и контактируют с нейронами, образуют нейроваскулярную единицу, регулируя проницаемость ГЭБ для клеток, в том числе и для иммунных (Iadecola C. et al., 2007; Abbott N.J. et al., 2006). В кровеносных сосудах головного мозга эндотелиальные клетки имеют низкую скорость транцитоза, высокую экспрессию эффлюксных белков, которые препятствуют парацеллюлярному транспорту растворенных веществ, отсутствуют фенестры и межклеточные щели, на внешней стороне ГЭБ имеет отрицательный электрический заряд (Huang X. et al., 2020). Значительное трансэндотелиальное электрическое сопротивление, формируемое эндотелиоцитами, составляет около 1500-2000 Ом, что также способствует поддержанию избирательной барьерной функции ГЭБ для полярных веществ и ионов. Для капилляров мышечной ткани оно составляет лишь 30 Ом (Butt A.M. et al., 1990). Поэтому питательные вещества проникают в мозг лишь через клеточную мембрану и плотные контакты, а не через фенестры как в капиллярах периферических органов.

Основными белками, обеспечивающими адгезию эндотелиальных клеток и формирование плотных контактов, являются клаудин-5 и клаудин-24 (Matter K. et al., 2003). Небольшие полярные вещества, такие как молекулы воды, с трудом диффундируют через гидрофобный бислой клеточной мембраны эндотелиоцитов. Однако благодаря большому количеству аквапор, вода хорошо проникает через мембрану эндотелиоцитов. На поверхности мембран клеток капиллярной сети головного мозга экспрессируются в основном аквапорин-4 (AQP4) и аквапорин-9 (AQP9) (Bloch O. et al., 2007). Отмечено снижение разных изоформ AQP4 при ГЭБ, что может влиять на

целостность ГЭБ и способствует развитию перитуморального отека. Гидрофобные вещества проникают в мозг с помощью специальных транспортных систем или через каналы клеточной мембраны. Для большинства других веществ возможна пассивная диффузия (Takakura Y. et al., 1991). Чем липофильнее и меньше вещество, тем легче оно диффундирует через клеточную мембрану, однако это также не гарантирует его прохождение через ГЭБ.

С помощью рецептор-опосредованного трансцитоза происходит перенос больших молекул. Высокомолекулярные соединения, такие как моноклональные антитела, рекомбинантные белки, векторы, нацеленные на белки-переносчики ГЭБ, такие как рецепторы трансферрина, остаются в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга (Pardridge W.M., 2005). Для переноса растворенных веществ из крови в клетки головного мозга на эндотелии капилляров экспрессируются специфические белки-транспортёры, такие как транспортёр глюкозы 1, анионов и ряд транспортёров для других веществ. ГЭБ экспрессирует активные транспортёры энкефалина (Zloković B.V. et al., 1987; Zloković B.V. et al., 1989), антидиуретического гормона (Zloković B.V., et al., 1990), [D-пеницилламин₂, D-пеницилламин₅]-энкефалина (DPDPE) (Thomas S.A. et al., 1997). Их количество больше на поверхности, обращенной в полость капилляра, чем на поверхности со стороны клеток головного мозга. В эндотелиальных клетках снижена экспрессия молекул адгезии лейкоцитов, что ограничивает проникновение иммунных клеток в ЦНС.

Эндотелиальные клетки ГЭБ содержат больше митохондрий, чем эндотелий других тканей, что может быть связано с большей потребностью в энергии, необходимой для транспорта ионов (Shuvaev A.N., et al 2016). Эндотелиоциты ГЭБ секретируют вещества, регулирующие функциональную активность стволовых клеток ЦНС в постнатальном периоде (Leukemia inhibitory factor – LIF, нейротрофический фактор мозга – BDNF, костный морфоген – BMP, фактор роста фибробластов – FGF и др.). В норме клетки эндотелия обеспечивают тромборезистентную поверхность ГЭБ, предотвращая адгезию лейкоцитов, тромбоцитов и активацию факторов коагуляции, изолируя головной мозг от контроля иммунной системы, что позволяет лишь некоторым мононуклеарным клеткам, например, активированным Т-лимфоцитам, мигрировать в ЦНС. Низкая экспрессия основных антигенов комплекса гистосовместимости, небольшое количество антигенпрезентирующих клеток, а также особенности лимфоциркуляции изолируют ЦНС

от воздействия иммунной системы (Кувачева Н.В. с соавт., 2013). Однако при многих заболеваниях, в том числе при опухолях ЦНС, данный механизм нарушен.

Опухоли головного мозга, такие как ГБ, а также метастазы периферических опухолей в головном мозге выделяют ряд веществ (Weiss N. et al., 2009), которые нарушают целостность ГЭБ и его избирательную проницаемость, эндотелий меняет заряд на положительный, клетки крови, которые имеют отрицательный заряд, активируют процессы агрегации и адгезии, закрывая место повреждения. При дегенеративных процессах в сосудистой стенке повышается концентрация факторов (коллаген, АДФ, адреналин, фактор 3-тромбоцитов), которые усиливают агрегацию и коагуляцию, способствуют образованию лейкотриенов, простагландинов, тромбоксанов, дополнительно усиливающих свободнорадикальные процессы, перекисное окисление липидов и снижающие образование простагландина (Муравьев А.В. с соавт., 2009; Жданов В.С. с соавт., 2017).

При повреждении ГЭБ вокруг опухоли, как правило образуется вазогенный отек перитуморальных тканей головного мозга (Квитницкий-Рыжов Ю. Н., 1988). При опухолях микроглия может активироваться по M1 или M2 фенотипам, соответственно, повреждая или защищая целостность ГЭБ. (Sumi N. et al., 2010; Haruwaka K. et al., 2019; Sumi N. et al., 2010; Nishioku T. et al., 2010). Провоспалительные цитокины (ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6), продуцируемые активированной микроглией, индуцируют перегруппировку и изменение экспрессии белков плотных контактов ZO-1 (zonula occluden-1), что приводит к патологической проницаемости ГЭБ. Другой причиной изменения проницаемости является увеличение экспрессии белков клеточной адгезии (селектин, ICAM-1), которые облегчают миграцию иммунных клеток в области воспаления через парацеллюлярные механизмы (Кувачева Н.В. с соавт., 2013).

Перициты многочисленными отростками охватывают капилляры и посткапиллярные венулы и имеют с ними прочную механическую связь, контактируют с эндотелиальными клетками, а также аксонами нейронов (Pavelka M. et al., 2010). Они синтезируют целый ряд вазоактивных веществ (Shepro D. et al., 1993) и регулируют стабильность сосудов, ширину их просвета, мозговой кровотока, секрецию белка внеклеточного матрикса (Winkler E.A. et al., 2011), помогают сохранить плотные контакты эндотелиальных клеток и регулируют трансцитоз, поддерживая целостность и нормальную проницаемость ГЭБ. Перициты передают нервный импульс от нейрона на

эндотелиоциты, в результате чего клетка накапливает или теряет жидкость и, как следствие, изменяется просвет сосудов (Кувачева Н.В. с соавт., 2013). Перициты считаются малодифференцированными клеточными элементами, участвующими в ангиогенезе, эндотелиальной пролиферации и воспалительных реакциях (Моргун А. В. с соавт. 2012). Они оказывают стабилизирующий эффект на новые сформировавшиеся сосуды и приостанавливают их рост, влияют на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток.

При опухолях нарушается связь между эндотелиальными клетками и перицитами. В органах и тканях с проницаемой сосудистой стенкой они могут мигрировать из кровеносного русла в межклеточное пространство. Перициты содержат большое количество белка актина участвующего в сокращении клеток, они могут изменять просвет капилляров и локально регулировать кровяное давление (Hirschi K.K. et al., 1996; Kutcher M.E. et al., 2009). Перициты обладают макрофагальной активностью (Rucker H.K. et al., 2000), содержат большое количество лизосом. Доказана их способность к фагоцитозу (Balabanov R. et al., 1996) и презентации антигенов (Fabry Z. et al., 1993). Резидентные глиальные клетки способствуют перепрограммированию перицитов головного мозга в интернейроны и обогащают локальные нейронные сети. Этот ответ усиливается сопутствующим ангиогенезом. Благодаря плотным контактам клетки нейроваскулярных единиц опосредованно влияют на митотическую активность, экспрессию генов и фенотип друг друга. Кровоток изменяется под действием эффектов, вызванных стрессом, гипоксией и некоторыми другими условиями. Кроме того, когда отсутствуют перициты, ГЭБ не способен блокировать некоторые нейро- и вазотоксические белки сыворотки крови, усиливается воспаление, а также нарушается обучение и память. Фактор роста тромбоцитов- β освобождается из эндотелиальных клеток капилляров головного мозга и связывается на перицитах с одноименным рецептором, инициируя быстрое увеличение их количества и миграцию для поддержания целостности кровеносной сети. Нарушение передачи данных сигналов приводит к апоптозу перицитов, что связано со многими нейродегенеративными заболеваниями, включая болезни Альцгеймера и рассеянный склероз (Weeney M.D. et al., 2016). Перициты регулируют пролиферативную активность эндотелиоцитов, создают ложе роста для эндотелиоцитов, активируют фактор роста эндотелиальной почки, участвуют в образовании и обновлении базальной мембраны.

Астроциты могут способствовать резистентности опухолей головного мозга к терапии с использованием НЧ (Farahani R.M. et al., 2019). Астроциты выделяют вещества, которые влияют на проницаемость эндотелия. Эндотелиоциты в свою очередь продуцируют ингибирующий лейкемию фактор, цитокин ИЛ-6, которые воздействуют на процесс дифференцировки астроцитов (Abbott N.J. 2002). Астроциты обеспечивают нейроны питательными веществами и поддерживают необходимую концентрацию электролитов внеклеточного пространства (Abbott N.J et al., 2006). Астроциты синтезируют большую часть необходимого клеткам мозга холестерина, который не проникает через ГЭБ. В составе миелина, находится 25 % от общего холестерина организма. (Björkhem I. et al., 2004). Транспортные систем ГЭБ контролируются астроцитами, которые окутывают своими окончаниями сосуды и контактируют непосредственно с эндотелиоцитами (Abbott N.J., 2002), оказывают существенное влияние на формирование плотных контактов и определяют их свойства (Luissint A.C. et al., 2012). Эндотелиоциты способны к повышенному эффлюксу ксенобиотиков из ткани мозга (Kadry H. et al., 2020). Астроциты, также как и перициты, передают регулирующие сигналы от нейронов к эндотелиальным клеткам через кальций-опосредованные и пуриnergические взаимодействия (Zonta M. et al., 2003; Ballabh P. et al., 2004). Астроциты секретируют факторы, которые являются ключевыми для функционирования ГЭБ, включая sonic hedgehog (Shh), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтины-1 (Ang-1), ангиотензинпревращающий фермент-1 (ACE-1), Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) и аполипопротеин E (APOE) (Sonar S.A. et al., 2018). Динамический внеклеточный компонент ГЭБ регулирует его структуру и функцию, влияя на межклеточные взаимодействия (Reed MJ, 2019). Плотные контакты ГЭБ состоят из белков окклюдина, клаудина и молекул адгезии в местах соединения, таких как zonula occludens (Tietz S. et al., 2015; Beutel O. et al., 2019), они ограничивают парацеллюлярную диффузию веществ между соединениями эндотелиальных клеток и латеральную диффузию мембранных белков. Белки плотных контактов взаимодействуют с компонентами цитоскелета, адгезивными соединениями и внеклеточным матриксом и регулируются различными физиологическими и патофизиологическими стимулами (Luissint A.C., 2012; Bhat A.A. et al., 2019). Клетки ГЭБ создают также ферментативный барьер, так как они экспрессируют ферменты – моноаминоксидазу, катехол-О-метилтрансферазу, фермент цитохрома P450 CYP1B1, глутатион S-трансферазы и другие,

которые метаболизируют и выводят биомолекулы, такие как нейротрансмиттеры и ЛВ (Grumezescu A.M., 2019).

Нарушение ГЭБ рассматривается как основной диагностический признак злокачественных глиом, менингиом и метастазов опухолей в головной мозг, которые выявляются при магнитно-резонансной томографии с контрастным усилением и компьютерной томографии (Mallick S., 2021). Известно, что в солидных опухолях экстравазация макромолекул значительно усиливается, что связывают с феноменом повышенной проницаемости кровеносных сосудов и удержания макромолекул – EPR. Ряд авторов полагает, что в опухоли в зоне активно растущих сосудов ГЭБ не может быть полностью сформирован. Атипичные кровеносные сосуды опухоли имеют неполноценное строение, что обуславливает патологию кровообращения: окклюзии, эмболии, тромбозы, кровоизлияния, которые препятствуют поступлению противоопухолевых веществ в ткани опухоли при их системном введении (Li Y. et al., 2020). Считают, что основной причиной недостаточной эффективности системной ХТ злокачественных глиом является наличие участков с сохранным ГЭБ, в том числе, в зонах инфильтративного роста клеток опухоли (Qin D. et al., 2021). Благодаря этому ГЭБ не позволяет проникать циркулирующим в крови продуктам обмена веществ и ксенобиотикам в мозг путем диффузии (Bartels A.L., 2011). Многие молекулы, в том числе ЛВ, не проникают через ГЭБ, потому что немедленно удаляются из эндотелиальных клеток с помощью активных (ATP-binding cassettes, ABC) и пассивных (Major Facilitator Superfamily) трансмембранных белков, таких как Р-гликопротеин (P-gp) он же MDR (Multidrug resistance), MRP (Multidrug resistance-related protein), BCRP (Breast cancer resistance protein) и других (Durmus S. et al., 2013), которые сверхэкспрессируются в опухолях. Лекарственные вещества немедленно выводятся из клеток, даже если пациенту дана высокая доза фармакологического препарата. Блокирование только одного из эффлюксных белков не приведет к преодолению резистентности, так как спектр белков и механизмов, участвующих в формировании резистентности опухолевых клеток разнообразен (Свирновский А.И. с соавт., 2007). Ингибирование активности эффлюксных белков даже может повысить их экспрессию (Wu X. et al., 2021). Проницаемость ГЭБ может изменяться под действием радиотерапии, что может быть использовано перед проведением ХТ. Размер фракций лучевой терапии может варьировать, однако фракция в 2 Гр может применяться для нарушения целостности ГЭБ

без особых побочных эффектов (Юсубалиева Г.М. с соавт., 2015). В эксперименте получены данные о том, что цитокины способствуют повышению проницаемости ГЭБ (Liu W.Y. et al., 2015; Sonar S.A. et al., 2018; Logsdon A.F. et al., 2020). Так стресс любого происхождения сопровождается ростом концентрации цитокинов в крови и повышением проницаемости ГЭБ. В результате циркулирующие в крови цитокины могут проникать в мозг, где выполняют «неиммунологические» функции. Ослабление барьерной функции ГЭБ и развивающаяся нейровоспалительная реакция способствуют массовой миграции дендритных клеток и лимфоцитов из периваскулярного пространства в ткани головного мозга. Клетки, участвующие в воспалении, способны проникать через ГЭБ. (Takeshita Y. et al., 2012). Периферические провоспалительные цитокины снижают экспрессию белка плотных контактов ZO-1 у мышей с опухолями (Wu T. et al., 2020). Fianco G. et al. (2017) используя модели ГБ *in vitro* и *in vivo*, установили связь между воспалением, ангиогенезом и химиорезистентностью. В ГБ при мезенхимальном фенотипе главными молекулярными следствиями эпигенетических нарушений является гиперэкспрессия главных регуляторов STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) и C/EBP β . STAT 3-опосредованная экспрессия генов связана с мезенхимальным фенотипом клеток ГБ, способностью к неоангиогенезу и устойчивостью к ЛВ (Liang S.F. et al., 2022). У пациентов с ГБ наблюдается дисфункция ГЭБ. На фоне роста опухоли снижается отток ликвора и интерстициальной жидкости и развивается перитуморальный (фокальный) отек, повышается проницаемость ГЭБ для химиопрепаратов, в том числе для Докс (Agarwal S. et al., 2011; Gerstner E.R. et al., 2007). Некоторые авторы уверены, что ГЭБ сохраняет свою барьерную функцию в зоне активного инфильтративного роста опухоли в окружающие ткани мозга (Donelli M.G. et al., 1992; Caruso G. et al., 2011). По крайней мере, можно полагать, что в разных зонах опухоли и перитуморальной зоне, на различных стадиях опухолевого роста, в зависимости от микроокружения и других факторов проницаемость ГЭБ может быть различной. Особенности ГЭБ в опухоли также способствуют созданию специфических состояний, таких как гипоксия и ацидоз, которые играют решающую роль в химиорезистентности ГБ, препятствуя ангиогенезу, апоптозу, репарации ДНК, окислительному стрессу, иммунному надзору, экспрессии и активности генов, связанных с множественной лекарственной устойчивостью.

Для доставки в мозг ЛВ, неспособных проникать через ГЭБ, применяют различные стратегии такие как: 1) нарушение ГЭБ, например при физических воздействиях –

сфокусированный ультразвук (McDannold N. et al., 2008), радиотерапия. 2) модуляция проницаемости ГЭБ с помощью гиперосмотических растворов таких как раствор маннита или вазоактивных веществ – брадикинина или его аналогов, цитокинов; 3) транспорт, проникновение и поглощение веществ, связанных с нейроиммунной системой, эндогенными транспортными системами, (переносчики глюкозы, аминокислот, инсулина, трансферрина); 4) блокирование активных переносчиков оттока, таких как р-гликопротеин (Qin D. et al., 2021) 5); миграция иммунных клеток из крови в мозг; 6) иммунная регуляция секреции клеток ГЭБ; 7) модуляция межклеточных соединений с использованием ингибиторов белков межклеточной адгезии (окклюдинов, клаудинов, кадгеринов), а также опосредованное воздействие на активность афферентных и эфферентных нервов (Goehler L.E. et al., 1999; Romeo H.E. et al., 2001; Neuwelt E. et al., 2008; Kanashiro A. et al., 2016; Erickson M.A. et al., 2018).

Возможно также локальное (интрацеребральное) введение ЛВ. Такой способ доставки позволяет значительно увеличить содержание ЛВ в тканях мозга, но является инвазивным и сопряженным с большим риском для пациента. Кроме того, интрацеребральное введение часто не дает желаемых результатов из-за ограниченной диффузии ЛВ из места введения (Pardridge W.M., 1999). Для улучшения распределения и удержания противоопухолевых веществ в тканях опухоли применяют липосомы (Han Y. et al., 2020).

Создание систем доставки ЛВ в головной мозг путем конъюгации со специфическими молекулами-векторами (в том числе, антителами) имеет определенные преимущества, так как в этом случае используются эндогенные механизмы транспорта (Pardridge W.M., 1999). Липосомы являются емкими носителями ЛВ. Так показано, что иммунолипосомы могут доставлять в мозг антрациклиновый антибиотик дауномицин (Huwyler J. et al., 1996) путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, однако эффективность липосомального Докс при лечении пациентов с ГБ невысока (Aryal M., et al., 2013).

Включение Докс в НЧ позволяет улучшить его доставку в головной мозг. Так наносомальная лекарственная форма Докс на основе НЧ из полибутилцианоакрилата (ПБЦА), модифицированных полисорбатом 80, проявляет высокую противоопухолевую активность в отношении ГБ 101.8 крыс. Увеличение продолжительности жизни леченных животных по сравнению с контрольными составило 85 %; у 25 % животных, выживших

в течение 6 месяцев, не было отмечено клинических и морфологических признаков опухолевого роста (Халанский А.С. с соавт., 2011). Использование полибутилцианоакрилатных НЧ, модифицированных поверхностно активным веществом полисорбатом 80 для доставки Докс в мозг с глиомой, значительно увеличивало продолжительность жизни животных с интрацеребральной опухолью, а в 30-40% случаев приводило к полной ремиссии в течение полугода (Petri V. et al., 2007). Токсичность Докс в составе ПБЦА-НЧ не превышала токсичности Докс (Gelperina S. et al., 2002). Различия в субхронической токсичности проявлялись в наибольшей степени при оценке воздействия на сердце и семенники (Макарова Н.П. с соавт., 2005), причем наименее токсичной была наносомальная форма, содержащая полисорбат 80. Пустые ПБЦА-НЧ (плацебо) не обнаружили ни острой и субхронической токсичности (Gelperina S. et al., 2010). Также морфологическое исследование показало, что применение терапевтической дозы Докс в стандартной лекарственной форме привело к развитию тестикулярной токсичности. В то же время при использовании наносомальной формы Докс наблюдали ослабление токсического влияния препарата на семенники, а применение с наносомальной лекарственной формой полисорбата 80 привело к значительному снижению гематотоксичности Докс (Gelperina S. et al., 2010).

Доставка Докс в мозг осуществляется также с помощью PLGA-НЧ (Gelperina S. et al., 2010; Wohlfart S. et al., 2011). Полимеры молочной кислоты (PLA) или ее сополимеры с гликолевой кислотой (PLGA) – это биосовместимые и биodeградируемые полимеры, которые широко используются в медицинской практике. В частности, микросферы из PLGA служат для получения депо-форм различных лекарственных препаратов – ЛП (в том числе рисперидон, октреотид, бусерелин и пр.).

По данным функциональной и морфологической оценки кардиотоксичность Докс, связанного с НЧ, снижается. Введение растворимого Докс приводило к развитию кардиотоксичности, которая наиболее ярко проявлялась на поздних сроках наблюдения (30-е и 61-е сутки после курса введений) и патоморфологически характеризовалась миоцитоллизом, контрактурными повреждениями кардиомиоцитов, утратой поперечной исчерченности мышечных волокон, появлением лимфоидно-макрофагальной инфильтрации (Zucchi R. et al., 2003). Морфологические изменения в миокарде после введения наносомальных форм Докс были подобны тем, которые обнаружены при введении Докс в стандартной лекарственной форме, но значительно менее выраженными:

количество и размеры очагов повреждения миокарда существенно уменьшались, лимфоидные инфильтраты отсутствовали. По данным ЭКГ отсутствовали признаки декомпенсации сердечной деятельности при использовании наносомальной формы Докс. Это феномен, описанный ранее для липосомальных и других наносомальных форм Докс (Soloman R. et al., 2008), объясняется изменением биораспределения, связанного с носителями препарата (Couvreur P., 2012). Так Докс-ПБЦА задерживался в организме крыс дольше, чем свободный. Константы периода полувыведения и среднего времени удержания увеличивались в 3,5 и 4 раза, соответственно, по сравнению с Докс, что свидетельствует о значительном накоплении антибиотика в тканях. При этом количество Докс (~ 1% введенной дозы), доставленное в мозг, было пропорционально относительной массе мозга (около 2% массы тела), то есть наносомальный Докс после внутривенного введения распределяется так, как если бы мозг не был защищен ГЭБ (Gelperina S. et al., 2010).

1.8 Характеристика наноразмерных форм лекарственных веществ

НЧ последние несколько десятилетий изучаются и применяются как система доставки лекарственных и диагностических веществ. НЧ могут быть небиodeградируемыми и биodeградируемыми (Tang L., et al., 2021). В состав НЧ могут быть включены антибиотики, ХТ препараты, цитокины, т.д. (Zaheer, Y. et al., 2022).

НЧ – это частицы, имеющие средние гидродинамические размеры менее 100 нм. Использование биосовместимых, с заданной скоростью их биodeградации позволяет создавать НЧ с особыми свойствами. НЧ, нагруженные ХТ препаратами, позволяют постепенно высвобождать действующее вещество, что приводит к повышению противоопухолевой активности и снижению системной токсичности.

НЧ обеспечивают проникновение лекарственных и диагностических веществ через ГЭБ и гематоопухолевый барьер при его системном введении, однако терапевтических концентраций не всегда удается достичь. Для увеличения накопления противоопухолевого ЛП в опухоли применяют конвекционный метод доставки, НЧ специфические моноклональные антитела с радиоактивной меткой и другие ЛВ вводят с помощью катетера, введенного в ткани опухоли (Mehta A.M. et al., 2017). Доклинические и клинические исследования проходят полимерные частицы, полимерные мицеллы (Liu L. et al., 2008), нано-оболочки (Loo C. et al., 2004), «квантовые точки» (Xing Y, et al., 2007),

магнитные НЧ, содержащие оксид железа (Provenzale J.M. et al., 2009), нанотрубки (Nduom E. et al., 2012), и многие другие.

Наноформы ХТ препаратов имеют ряд преимуществ по сравнению с использованием обычных форм при системном введении. Они лучше проникают через ГЭБ, не удаляются ретикулоэндотелиальной системой организма, и они, в результате, циркулируют более продолжительное время. На модели глиомы было показано, что НЧ таксола (паклитаксел), покрытые полиэтиленгликолем, обладали более высокой биодоступностью по сравнению с другими формами этого ЛП (Jiang X. et al., 2011).

Сложность при использовании наноформ химиопрепаратов заключается в подборе адекватной дозы. В настоящее время разрабатываются термочувствительные НЧ, которые выделяют действующее вещество при повышении температуры (Agarwal A. et al., 2011). НЧ могут захватываться макрофагами и другими клетками печени, почек, легких, селезенки и лимфатических узлов, что значительно снижает их количество. Этот захват может быть снижен за счет биосовместимости специфичных структур оболочки НЧ. Интегрины, гиперэкспрессия которых отмечается на границе роста глиальных опухолей, повышают проницаемость ГЭБ. Одним из пептидов, которые участвуют в связывании интегринов с мембраной эндотелия, является АГА-пептид (Аргинилглициласпарагиновая кислота – трипептид, состоящий из L-аргинина, глицина и L-аспарагиновой кислоты). При конъюгации АГА-пептида с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или полиэтиленимином (ПЭИ) формируется наноформа направленного (таргетного) действия в отношении глиальной опухоли. Недавно было также показано, что трансферрин повышает доставку конъюгированного с ним препарата через ГЭБ (Johnsen K.V. et al., 2019; Thomsen M.S. et al., 2022). При этом современные технологии позволяют осуществлять многоступенчатый синтез многокомпонентного ЛВ.

Для преодоления ГЭБ и успешной доставки разработаны конъюгаты полицефин – содержащие НЧ, включающие в себя: (1) рН-зависимые структуры, позволяющие избежать эндосомального захвата; (2) флуоресцентный краситель, позволяющий отслеживать распространение ЛВ; (3) структуры, оптимизирующие солубилизацию; (4) терапевтический агент и (5) моноклональные антитела, обеспечивающие направленное действие ЛВ. Такие биоконъюгаты проходят через стенки кровеносных сосудов в опухоль путем трансцитоза и направленно поступают в клетки опухоли путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Разработки наноконъюгатов находятся на стадии

доклинических исследований и еще достаточно далеки от внедрения в клиническую практику (Daniels et al., 2013).

Таким образом, несмотря на определенные достижения в области разработки адресной доставки ЛВ к опухоли, разработка безопасных и неинвазивных методов таргетной терапии по-прежнему представляет собой серьезную проблему, для решения которой нужны новые стратегии.

1.9 Наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот

1.9.1 Состав, свойства и характеристики наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот

Один из наиболее перспективных полимеров, используемых для изготовления систем доставки ЛВ – PLGA (Essa D. et al., 2020). Этот полимер является биосовместимым и биоразлагаемым, демонстрирует широкий диапазон времени гидролиза молекулы и ее выведения, возможно изменение формы и размера НЧ, что способствует повышению растворимости и биодоступности многих ЛВ. PLGA может увеличивать проникновение ЛВ через различные биологические барьеры, слизистые оболочки желудочно-кишечного, респираторного тракта, ткани глаза (Spindler L.M. et al., 2021). PLGA одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для доставки ЛВ и диагностики онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также для вакцин и тканевой инженерии (Makadia H. K., 2011). PLGA-НЧ применяют в качестве систем доставки противоопухолевого веществ при лечении пациентов с опухолями (NCT04751786). Однако многие ЛП на основе PLGA-НЧ находятся на уровне клинических испытаний (Kumskova N. et al., 2020). Отсутствие широкого применения препарата связано со сложностью физико-химических свойств наночастиц. Из последних препаратов на основе НЧ, которые были одобрены FDA – это паклитаксел, связанный с альбуминовыми НЧ, который применяется для лечения опухолей молочной железы (Vobo D. et al., 2016).

Наиболее часто в фармакологии используют сополимер полимолочной (PLA) и полигликолевой кислот (PGA) (рис. 4). Полимолочная кислота содержит асимметрический углерод, который в классических стереохимических терминах обычно описывается как форма D или L. Присутствие боковых метильных групп в ПЛА делает его более гидрофобным, чем ПГА, и, следовательно, богатые лактидом сополимеры

PLGA менее гидрофильные, поглощают меньше воды и впоследствии медленнее разлагаются (Essa D. et al., 2020). В случае с PLGA есть возможность конструирования практически любой формы и размера частиц. Он растворим в широком спектре обычных растворителей, включая хлорированные растворители, тетрагидрофуран, ацетон или этилацетат (Essa D. et al., 2020).

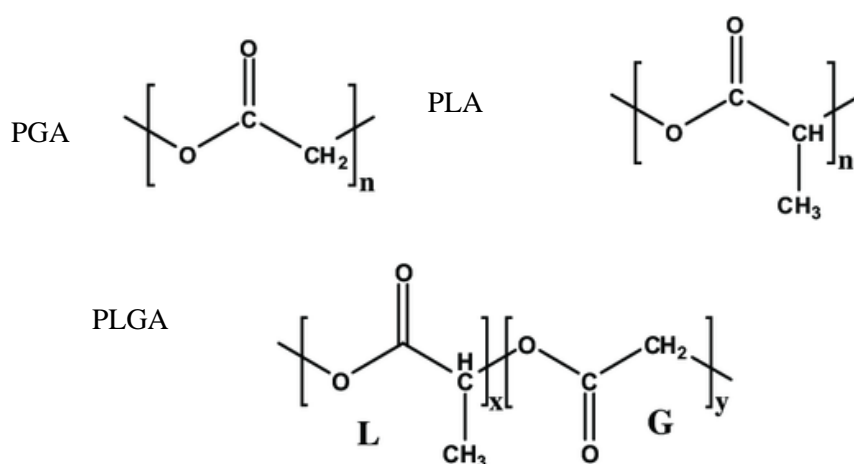


Рисунок 4. Химическая формула сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) и его составляющих мономеров – полимолочная (PLA) и полигликолевая (PGA) (Essa D. et al., 2020)

Показано, что физические свойства PLGA зависят от множества факторов, включая исходную молекулярную массу полимера, соотношение молочной и гликолевой кислот в молекуле, размера, а также молекулярной массы и стереохимии полиэфира (Kim B.S. et al., 2008; Mandl H. K. et al., 2019). Скорость биodeградации PLGA на составляющие его мономеров варьирует в зависимости от процентного содержания его мономеров и является одной из ключевых характеристик в моделировании доставки ЛВ. Необходимо учитывать все эти факторы, чтобы обеспечить максимальный терапевтический эффект применения НЧ.

Так как между молочной и гликолевой кислотами образуются сложноэфирные связи, они легко разрушаются под воздействием воды. Скорость гидролиза можно регулировать, варьируя соотношение молочной/гликолевой кислот: увеличение содержания гликолевой кислоты приводит к увеличению гидрофильности и смачиваемости полимера и, следовательно, его более быстро протекающему гидролизу, что, в свою очередь, способствует высвобождению ЛВ (Bobo D. et al., 2016). В полимере

PLGA соотношение ПЛА/ПГА может быть различным (30:70, 60:40 и т.д.), но при исследовании свойств было выявлено, что соотношение 50:50 демонстрирует самую быструю деградацию, ведущую к разрушению сложноэфирных связей и распаду до мономеров (Makadia Н. К., 2011).

Считается, что PLGA-НЧ относительно устойчивы к воздействию солей и рН, и могут медленно высвобождать иммобилизованные ЛВ путем гидролиза полимера. На скорость деградации полимера и высвобождение ЛВ из НЧ также влияет молекулярная масса PLGA. Так, например, PLGA-НЧ с молекулярной массой 60 кДа, освобождали около 90% инкапсулированного эстрадиола в течение 3-4 недель. При увеличении молекулярной массы полимера до 300 кДа высвобождение снижалось до 55-25% (Mittal G. et al. 2007).

1.9.2 Биораспределение сополимера молочной и гликолевой кислот

PLGA как наноноситель ЛВ не оказывает токсического эффекта при использовании в биомедицинских целях, поскольку мономеры PLGA – молочная и гликолевая кислоты – естественные метаболиты цикла Кребса и, в конечном итоге, они распадаются до диоксида углерода и воды (Makadia Н.К. 2011; Sanna V. et al., 2012; Essa D. et al., 2020) (рис. 5).

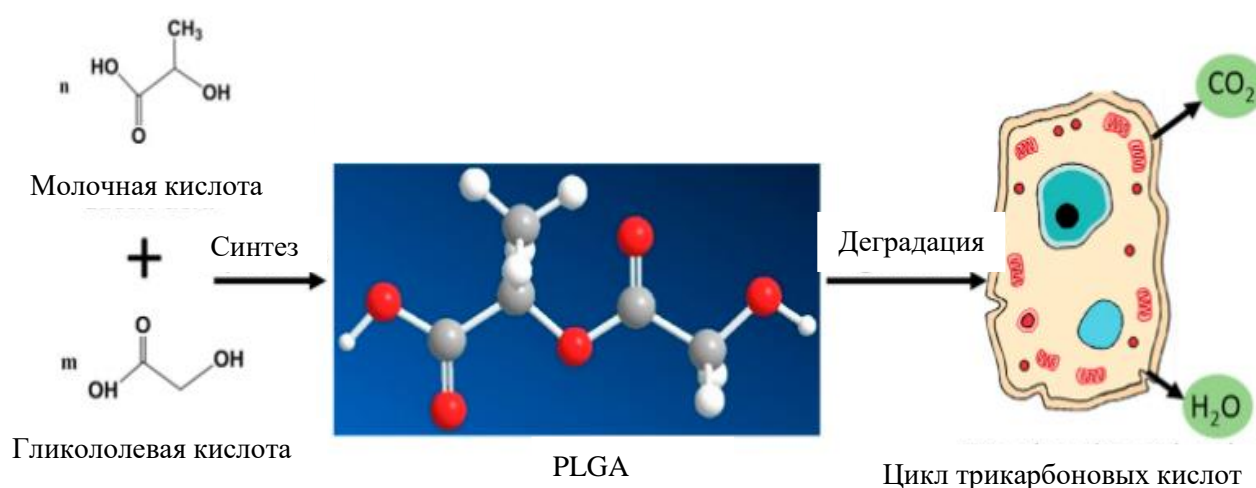


Рисунок 5. Синтез и физиологическое расщепление PLGA (Essa D. et al., 2020)

Одним из критериев биодоступности НЧ являются их размеры. НЧ диаметром 120 нм достигают тканей легких и костного мозга в большем количестве, чем НЧ диаметром 160 нм и больше. Это свойство биодоступности необходимо учитывать при разработке наноматериалов (Mandl H. K. et al., 2019).

Биораспределение и фармакокинетика PLGA имеют нелинейный и дозозависимый характер. Показано, что PLGA-НЧ накапливаются в печени, костном мозге, лимфатических узлах, селезенке и перитонеальных макрофагах (Essa D. et al., 2020; Mandl H. K. et al., 2019).

Деградация PLGA-НЧ *in vivo* осуществляется в два этапа: на начальном этапе в результате гидролиза полимера происходит быстрое высвобождение 30% ЛВ, после чего наступает фаза более длительного разложения PLGA (Essa D. et al., 2020). Поверхность PLGA гидрофобна из-за метильных групп лактидов, поэтому НЧ легко обнаруживаются мононуклеарными фагоцитами и поглощаются ими. Продукты распада выводятся из кровотока с мочой (Kumari A. et al., 2010).

Высокая вероятность поглощения PLGA-НЧ макрофагами может привести к тому, что введенное ЛВ не достигнет клеток-мишеней, и вместо этого либо выводится из организма, либо аккумулируется в других органах, таких как печень и селезенка. Чтобы избежать этого, проводится модификация поверхности PLGA (Mandl H. K. et al., 2019).

Одной из таких модификаций является использование ПЭГ как гидрофильного покрытия на поверхности PLGA, который способствует защите гидрофобных метильных групп от ретикулоэндотелиальной системы. PLGA-НЧ модифицированные ПЭГ образуют амфифильный диблочный сополимер (Kumari A. et al., 2010). В качестве других модификаторов PLGA-НЧ применяют хитозан, поллоксамер и поллоксамины. Они действуют за счет изменения электростатических и гидрофобных свойств поверхности PLGA-НЧ. Дополнительным средством повышения терапевтической эффективности PLGA как носителя ЛВ является включение специфичных лигандов, например, моноклональных антител (Sun X. et al., 2017).

1.9.3 Доксорубицин-сополимер молочной и гликолевой кислот

Для снижения токсических эффектов Докс и сохранения его высокой противоопухолевой активности разрабатываются различные системы доставки ЛВ, которые могут быть альтернативой прямого введения Докс. В качестве таких систем

доставок применяются липосомы, гидрогели и НЧ. PLGA-НЧ являются перспективным средством доставки Докс (Yildiz T. et al., 2018). Нагруженные Докс PLGA-НЧ продемонстрировали снижение цитотоксических эффектов (Mittal G. et al., 2007).

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что высвобождение Докс из PLGA-НЧ в течение первых 6 часов гидролиза полимера не оказывает большого влияния на высвобождение Докс. По истечении этого времени начинается быстрая диффузия ЛВ, которое находится на поверхности или в подповерхностном слое полимера. Эту стадию называют быстрым высвобождением. Это связано с эффективной диффузией ЛВ через PLGA матрицу, полимерные цепи которой стали более короткими после первичного гидролиза. Отмечено, что высвобождение химиопрепарата из PLGA-НЧ с меньшей молекулярной массой происходит быстрее за счет более высокой скоростью гидролиза полимера. В последующем диффузия Докс замедляется (Bobo D. et al., 2016).

Инкапсулированный в PLGA-НЧ Докс не оказывает значительного влияния на физико-химические свойства полимера, таким образом, использование наносомального Докс становится более предсказуемым (Deng L. et al., 2014).

Таким образом, PLGA-НЧ применяются в соединении с химиопрепаратами, в частности с Докс, способствуя лучшему проникновению ЛВ в клетки-мишени различных опухолей. Они разлагаются на естественные продукты: молочную и гликолевую кислоты. Дальнейшее изучение PLGA позволит создавать молекулы определенных размеров для доставки ЛВ к определенным клеткам.

1.10 Моделирование опухолей головного мозга

Наиболее распространенные модели опухолей головного мозга получены на крысах – беспородных или линейных – Wistar, Fischer 344 и Sprague-Dawley. Модели опухолей головного мозга у грызунов были индуцированы путем введения канцерогенов ДМБА (7,12-диметил-5,6-бензо[а]антрацен) в мозг мышей или N-метилнитрозомочевины беременным самкам крыс и последующей многократной перевивкой полученных опухолей животным реципиентам (Яблоновская. Л. Я. с соавт., 1967). В начале 1970-х годов были опубликованы работы, которые описывали метод получения опухолей головного мозга у крыс при двукратном введении N-метилнитрозомочевины либо однократном – N-этил-N-нитрозомочевины беременным самкам, что позволило разработать ряда моделей, которые обладают высокой

воспроизводимостью и не требуют введения канцерогена непосредственно в мозг (Barth R. F., 1998). К концу прошлого века экспериментальная нейроонкология насчитывала около десяти моделей. При сравнении различных моделей глиомы мозга не было выявлено идеальной, которая соответствовала бы всем требованиям моделирования, однако в зависимости от целей и задач исследования можно подобрать опухоли с нужной характеристикой.

ГБ 101.8 крысы разработана и широко применяется в научных исследованиях как в России, так и за рубежом (Wohlfart S. et al., 2011; Халанский А.С. с соавт., 2013; Халанский А.С. с соавт., 2014; Liubich L.D. et al., 2015; Kucheryavenko A.S. et al., 2021). В настоящее время широко используется метод ксенотрансплантата – введение культур клеток или ткани опухоли ГБ человека в головной мозг иммунодефицитных грызунов, а также генетически модифицированным животным (Candolfi M. et al., 2007; Oh T. et al., 2014).

1.10.1 Глиобластома 101.8 крысы

ГБ 101.8 по морфологии, степени злокачественности соответствует критериям ГБ человека. Морфологическая характеристика опухоли экспериментальной ГБ сходна с ГБ у человека. Опухоли получают путем имплантации фрагмента опухолевой ткани ($\sim 10^6$ клеток) животным-реципиентам, благодаря этому сохраняются морфологических особенностей ГБ 101.8 (Авцын А.П. с соавт., 1993). Перевиваемая ГБ крысы 101.8 растет как первичная культура *in vitro*, однако ее клеточную линию получить до сих пор не удалось. По морфологии ГБ 101.8 крысы злокачественная глиальная опухоль с высокой клеточностью и митотической активностью, фокальной микроваскулярной пролиферацией, образованием очагов некроза и кровоизлияниями. Клетки опухоли имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Ядра плеоморфны, мелкого или среднего размера с атипичным расположением гетерохроматина. Вокруг очагов некроза опухолевые клетки формируют псевдопалисады. Сосуды опухоли, развивающиеся в результате стимуляции ангиогенеза имеют разный диаметр, форму и строение. Как правило, они извитые, лакунообразно расширенные, с очаговой пролиферацией эндотелия. Эндотелиальная выстилка сосудов очагово нарушена. Границы опухоли нечеткие с выраженной инфильтрацией окружающей ткани головного мозга опухолевыми клетками, капсула отсутствует (Авцын А.П. с соавт., 1988).

1.10.2 Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 крысы

Растущий опухолевый узел четко определяется на срезе головного мозга почти у всех животных уже на 6 сутки после имплантации. В эти сроки растущая ГБ имеет небольшие размеры и однородное строение. Кровеносные сосуды заметно не изменены и некротические процессы слабо выражены. Радиоавтографически в первичной культуре опухоли 101.8 выявлен высокий пролиферативный пул (72-76% включающих ³H-тимидин клеток), а также растянутый период G₁ (38 ч.), короткий S-период (5 ч.) и период G₂, равный 8 ч. (Авцын А.П. с соавт., 1988).

При достижении опухолью больших размеров (10 сутки) в центральной части опухоли формируются обширные поля некрозов. Также появляются лакунообразные сосудистые полости и мелкие кровоизлияния. В поздние сроки (12-18 сутки) ГБ достигает зрелой стадии и в дальнейшем ее основные признаки остаются неизменными.

При иммуногистохимическом анализе экспрессии маркера пролиферации Ki67 в гистологических срезах процент опухолевых клеток, экспрессирующих Ki67, находился в диапазоне от 84-86% во время раннего периода роста (6-10 сутки после трансплантации) и до 76% в поздние сроки роста (12-18 сутки) (Wohlfart S. et al, 2011).

Границы зрелой опухоли нечеткие с выраженной инфильтрацией окружающей ткани мозга опухолевыми клетками, капсула отсутствует. Структура опухоли неоднородна. Гистологическое строение экспериментальной ГБ характеризуется плотным расположением небольших по размерам хорошо прокрашенных полиморфных клеток, наличием обширных центральных «ландшафтообразных» некрозов и псевдопалисадов вокруг них. Клетки ГБ имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. В ткани опухоли видны делящиеся клетки и большое количество патологических митозов. Митозы чаще всего встречаются в краевой зоне опухоли, граничащей с нормальной тканью мозга, и около крупных сосудов. Патологические митозы составляли около 20,1% от их общего количества (Халанский А.С. с соавт., 2003).

Сосуды в зрелой опухоли расположены неравномерно. Местами наблюдаются единичные сосуды на большой площади, местами скопления в виде розеток. Число сосудов в поле зрения опухоли меньше, чем в соответствующей безопухолевой зоне головного мозга контралатерального полушария. На ранних стадиях роста ГБ количество сосудов больше по сравнению с поздними, где их число более постоянно. Большинство сосудов имеют разный диаметр и измененную форму: извитые, с неровными контурами

просвета или лакунообразно расширенные. Средний размер сечения сосудов опухоли больше, чем сосудов контралатерального неизмененного участка мозга, клетки эндотелия расположены реже (Левитман М.Х. с соавт., 1990). Эндотелиальная выстилка сосудов очагово нарушена, вследствие чего в ткани опухоли определяются многочисленные кровоизлияния (Kreuter J. et al., 2008).

Таким образом, по биологическим свойствам и морфологической картине, а также по ряду параметров, сходным с таковыми для глиальных опухолей мозга человека, перевиваемая ГБ 101.8 крысы соответствует критериям ГБ человека и может быть использована в экспериментальной нейроонкологии, как адекватная модель для оценки новых подходов к лечению опухолей мозга.

1.10.3 Биологические свойства глиобластомы крысы 101.8

Для оценки степени повреждения ткани мозга используется исследование концентрации белков группы S100, которые представляют собой уникальные для нервной ткани кислые кальций-связывающие белки, отличающиеся по заряду и массе. Концентрация в мозге в 100000 раз превышает их содержание в других тканях и составляет до 90% растворимой фракции белков нервных клеток. Использование иммуноферментного анализа показало, что содержание белка S100 в ткани ГБ 101.8 было значительно снижено, и оно колебалось в пределах 3-24% от неизменной ткани головного мозга. Этот же метод выявил присутствие в опухоли 101.8 глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), который также считается маркером злокачественных новообразований мозга у человека (Ahmadipour Y. et al., 2020). Было обнаружено повышение содержания GFAP (в среднем на 158%) на ранних пассажах (11-19-й) ГБ 101.8 и снижение практически до нормы (в среднем на 110%) на поздних пассажах (39-54-й), по сравнению с нормальным мозгом. В то же время содержание GFAP в отдельных опухолях колебалось от 37 до 225%. При иммуногистохимическом исследовании с антителами против GFAP, если не учитывать реактивные астроциты в составе астроцитарного вала вокруг новообразования, в паренхиме опухоли встречались только единичные GFAP-позитивные структуры. В то же время плотные скопления и группы GFAP-позитивных клеток можно было наблюдать вокруг сосудов. Это позволяет с большой долей вероятности предположить, что GFAP-позитивные клетки скорее

связаны с реактивной реакцией астроцитарной глиии на опухоль мозга или с так называемыми «рекрутируемыми» астроцитами (Халанский А.С. с соавт., 1973).

Клетки ГБ 101.8 экспрессируют на своей поверхности молекулы клеточной адгезии N-CAM типа А, причем уровень экспрессии увеличивался с повышением времени существования опухоли в мозге крысы. При этом наблюдалась обратная корреляция уровней экспрессии N-CAM и фибронектина (Krivko I.M. et al., 1992). Клетки ГБ 101.8 в значительном количестве экспрессировали рецепторы к глюкокортикоидам. При трансплантации этой опухоли самцам и самкам их присутствие наблюдалось примерно в одинаковом количестве случаев (соответственно, 75 и 71%), однако уровень экспрессии в опухоли был значительно выше у самцов (30,8 фмоль/мг белка), чем у самок (11,4 фмоль/мг белка) (Смирнова З.С. с соавт., 1999). На поверхности клеток ГБ 101.8 также были обнаружены рецепторы к эпидермальному ростовому фактору и трансферрину (Кирпичников М.П. с соавт., 1998).

Рост ГБ 101.8 сопровождается активацией NO-синтазы и накоплением стабильных окисленных метаболитов (Смирнова З.С. с соавт., 1999). При этом установлена корреляционная связь между дестабилизацией процессов перекисного окисления липидов в мозге и крови экспериментальных животных и интенсивностью роста опухоли как следствие имплантации ткани ГБ 101.8. В мозге у больных животных на фоне достоверного повышения активности перекисного окисления липидов отмечали снижение активности системы антиоксидантной защиты (Розуменко В.Д. с соавт., 2008).

При изучении ГБ 101.8 методом динамической термоэнцефалографии выявлены температурная асимметрия (понижение температуры дорзальной коры над интрацеребральной опухолью) и медленные локальные температурные колебания в коре головного мозга у крыс, которые связаны с волнами распространяющейся депрессии и могут усиливаться в ответ на сенсорные и другие раздражители (Кузнецова Г.Д. с соавт., 1988).

В клетках ГБ 101.8 обнаружена высокая активность *SOX-2* – одного из генов стволовых клеток, отмеченного в эмбриональных нейральных клетках, и гена хрящевого гликопротеина *HC gp-39*. Активность последнего была найдена в высокозлокачественных глиомах у человека, что, возможно, может иметь диагностическое значение в качестве молекулярного маркера злокачественных глиом (Гарифулин О.М. с соавт., 2002).

1.10.4 Применение перевиваемого штамма глиобластомы крысы 101.8 для оценки противоопухолевой активности терапии в эксперименте

ГБ 101.8, как и другие экспериментальные опухоли мозга из коллекции ФГБНУ НИИМЧ им. ак. А. П. Авцына, используется как экспериментальная модель для изучения вопросов биологии и патологии глии и глиальных опухолей, а также для экспериментальной оценки новых противоопухолевых подходов для терапии опухолей мозга. На ГБ 101.8 проводились разнообразные исследования противоопухолевого действия цитостатиков, эффекта радио- и химиотерапии, а также средств доставки и способов направленного транспорта препаратов к опухоли мозга (Герасимова Г.К. с соавт., 1996; Kniger S.C. et al., 2004; Ambrosi A. et al., 2006).

В Институте нейрохирургии им. А.П. Ромоданова Украины на модели ГБ 101.8 крысы проводили исследования противоопухолевой активности различных цитостатиков – хлофидена, бротеофена, винкристина, фторафура, фторурацила, надулана, проспидина и антибиотиков Докс и реумицина. Наиболее активным в отношении этой опухоли оказался хлофиден, наименее – проспидин и бротеофен (Ромоданов А.П. с соавт. 1981; Олейник Г.М. с соавт., 1992). Противоопухолевое действие препаратов характеризовалось дистрофическими изменениями опухоли, усилением образования некрозов и кровоизлияний. На клеточном уровне отмечали появление пикнотичных и «голых» ядер, клеточных теней, а также снижение митотической активности (Ромоданов А.П. с соавт., 1981). Эффект некоторых из этих препаратов усиливался при интратекальном введении: увеличение продолжительности жизни животных (УПЖ) для реумицина достигало 67%, для проксифена – 60,6%, проспидина – 31%. Наиболее выраженный эффект наблюдали при прорастании опухоли в желудочки мозга.

Высокий противоопухолевый эффект глюкокортикоида кортикостероида и цитостатика «Кортифена» (сложный эфир хлорфенацила и 11-дезоксиде-17- α -кортикостерона) в отношении ГБ 101.8 очевидно обусловлен наличием рецепторов к глюкокортикоидам на клетках опухоли. По своему противоопухолевому действию на ГБ 101.8 «Кортифен» был сравним с цисплатином, применяемым в стандартной схеме лечения ГБ. Лечение «Кортифеном» позволило повысить УПЖ на 44-113%, при этом у 33-44% животных наблюдали длительную ремиссию (Smirnova Z.S. et al., 1997).

Иммуномодуляторы на основе алкалоидов чистотела, модифицированных тиофосфамидом («Амитозин») или тиофосфорной кислотой («Украинин») оказывали

дозозависимое противоопухолевое действие, причем «Украинин» по своей эффективности был близок к цисплатину (УПЖ 33-37,5 %) и, кроме того, вызывал активацию лимфоцитов (Лисяный Н.И. с соавт., 1986; Семенова И.М. с соавт., 2011).

Глиому 101.8 неоднократно использовали для оценки эффективности отечественных фотосенсибилизаторов «Фотосенс» и «Тиосенс» (фталоцианины алюминия). Показано, что эти препараты проникают через ГЭБ и селективно накапливаются в опухолевой ткани мозга. Так через 24 ч после внутривенного введения накопление «Фотосенса» в опухоли превышало его накопление в нормальной глии в 20-25 раз; при этом препарат не накапливался в нейронах. Последующее лазерное облучение вызывало цитодеструкцию ГБ (Розуменко В.Д. с соавт., 2001).

Комбинированное лечение ГБ 101.8, включавшее декомпрессионную краниотомию, интраоперационную фотодинамическую терапию (ФДТ) с «Тиосенсом» и последующую ХТ темозоломидом, приводило к излечению 50% крыс (Коган Е.А. с соавт., 2009). У остальных 50% животных УПЖ составляло 127%. Монотерапия с использованием «Тиосенса» давала небольшой эффект (УПЖ 22%). При патоморфологическом исследовании через 72 ч после ФДТ отмечены выраженные деструктивные изменения опухоли: некроз и апоптоз опухолевых клеток, тромбоз и разрушение сосудов с обширными кровоизлияниями. Митозы в ткани ГБ 101.8 практически не определялись.

ГБ 101.8 была использована также для экспериментального обоснования применения искусственной кратковременной гипергликемии как радиосенсибилизирующего фактора для повышения эффективности радиотерапии злокачественных новообразований мозга. Показано, что скорость накопления и утилизации глюкозы в ГБ значительно превышает эти процессы в нормальной ткани мозга, что свидетельствует о высокой гликолитической активности в малигнизированных глиальных клетках. Усиление гликолиза приводит к избыточному накоплению в опухоли кислых продуктов; в частности, в клетках ГБ наблюдается двукратный избыток молочной кислоты. Предполагается, что изменение внутриклеточного рН может повышать чувствительность клеток ГБ к внешним воздействиям, в том числе и к облучению (Логинов В.М. с соавт., 1985).

В опытах *in vitro* показано, что химерный белок эпидермальный фактор роста тиоредоксин эффективно связывается с клетками-мишенями ГБ 101.8, что позволяет

обеспечить эффективный транспорт конъюгата эпидермальный фактор роста с цитотоксической А-субъединицей рицина к клеткам ГБ (Кирпичников М.П. с соавт., 1998).

Эффект цисплатина в процессе экспериментальной терапии ГБ 101.8 значительно увеличивался при использовании его в составе полиметилметакрилатных НЧ, поверхность которых была модифицирована антителами к белку щелевых контактов коннексину-43. Гиперэкспрессия коннексина-43 отмечается на мембране реактивных астроцитов в перитуморальной зоне и на клетках ГБ (Юсубалиева Г.М. с соавт., 2012). Было достигнуто значительное и достоверное УПЖ не только по сравнению с контролем, но и при сравнении цисплатина в НЧ со свободным цисплатином (106 и 77%, соответственно). Кроме того, использование НЧ снижало токсичность препарата (Baklaushev V.P. et al., 2013).

Таким образом, перевиваемая ГБ 101.8 крысы представляет собой злокачественную ГБ, которая характеризуется высокими темпами роста и морфологической характеристикой, сходными с ГБ человека IV степени. Среди основных отличий экспериментальных глиом от опухолей человека называют отсутствие гетерогенности. Тем не менее, опухоли мозга лабораторных животных в течение длительного времени были и остаются, несмотря на появление новых методов: ксенотрансплантация, использование клеточных линий, сфероидов и т.д., основным инструментом поиска и оценки новых подходов к лечению опухолей мозга из-за относительной доступности и высокой воспроизводимости результатов.

ГБ 101.8 крысы является наиболее адекватной моделью для экспериментальной нейроонкологии. Со времени получения в 1968 году она неоднократно использовалась в качестве экспериментальной модели для разработки новых подходов к лечению опухолей мозга. Проведенные исследования охватывают широкий спектр направлений, таких как экспериментальная ХТ с использованием противоопухолевых препаратов разных классов, включая препараты для фотодинамической терапии, а также изучение методов усиления противоопухолевого эффекта препаратов, в том числе разработка средств доставки ЛВ через ГЭБ, и к опухолям мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

ГБ в результате пересмотра классификации опухолей ЦНС ВОЗ (2021) относится к диффузным глиальным опухолям головного мозга взрослых, 4 степени злокачественности с молекулярно-генетическим профилем: IDH-дикого типа, с мутацией промотора TERT, амплификации гена *EGFR*, сочетание увеличения 7 хромосомы с потерей всей или части 10 хромосомы (+ 7/-10). Как правило опухоль расположена в полушарии головного мозга реже в спинном мозге, имеет агрессивный рост и крайне неблагоприятный прогноз. Примерно в 90% случаев ГБ возникает у людей старше 50 лет. ГБ составляет около половины от всех злокачественных опухолей ЦНС у взрослых. Долгосрочная (более 5 лет) выживаемость пациентов с ГБ остается крайне низкой и не превышает 6 %. Причины возникновения ГБ не ясны, однако доказано, что опухоли ЦНС возникают в результате воздействия радиации, при наследуемых и спонтанных опухолевых синдромах, связанных с мутациями определенных генов. Возможно, что источником развития ГБ являются плюрипотентные нейральные стволовые клетки, которые находятся в зубчатой извилине гиппокампа и под эпендимой желудочков головного мозга. Морфологически ГБ – высококлеточные опухоли и, как и все диффузные глиомы, инфильтрируют прилежащие ткани головного мозга.

Современный стандарт лечения ГБ включает такие методы: хирургический, радио- и химиотерапию темозоломидом, терапию переменным электрическим полем, и в случае выявления изменений в генах *NTRK* или *BRAF* таргетную терапию их ингибиторами. Эффективного способа лечения ГБ до сих пор не существует. Терапия ГБ затруднена из-за устойчивости опухолевых клеток к известным методам терапии, которые, в свою очередь, оказывают выраженный негативный эффект на неопухолевые клетки. Системная ХТ при ГБ ограничена эффективна в силу высокой токсичности для здоровых тканей, устойчивости клеток опухоли к противоопухолевым препаратам, а также наличия биологических барьеров (ГЭБ, гематоопухолевый) в опухолях головного мозга, препятствующих поступлению ЛВ, тем самым не более 1-2 % ЛВ достигает ткани опухоли. Поэтому ведется поиск и разработка низкоинвазивных новых подходов к лечению опухолей головного мозга, способных повысить эффективность лечения без повышения или даже снижающих токсичность ЛВ на здоровые ткани.

Противоопухолевый антибиотик Докс, а также его липосомальные формы применяются в ХТ опухолей, но не ГБ, однако показана его эффективность *in vitro* и при

внутриопухолевом введении при опухолях головного мозга. Эффективность его действия ограничена, так как он не проникает через ГЭБ, а также токсичностью для здоровых тканей при его системном введении. Один из подходов, способствующих преодолению указанных трудностей – применение в качестве носителей ЛВ систем доставки – липосом, НЧ, клеток, клеточных везикул, скаффолдов. PLGA-НЧ одобрены FDA, биоразлагаемые, обладают высокой емкостью загрузки ЛВ, относительно стабильны, способны пролонгировано высвобождать ЛВ, улучшают растворимость плохо растворимых ЛВ, увеличивая их биодоступность. Во многих работах показано повышение противоопухолевой эффективности и снижение системной токсичности Докс при его включении в PLGA. Механизмы данных эффектов до конца не изучены. ПГЛА-НЧ относятся к пассивным средствам доставки ЛВ. Предполагают, что НЧ накапливаются и удерживаются в тканях опухоли, при их системном введении, за счет несовершенства сосудистой сети опухоли (EPR-эффект) – вновь сформированные кровеносные сосуды в опухоли имеют тонкие стенки с фенестрами, плотные контакты между эндотелиальными клетками не успевают сформироваться, перициты, окружающие вновь сформированные сосуды, выявляются в меньшем количестве либо вообще отсутствуют. Кроме того, сформированные сосуды могут препятствовать поступлению ЛВ из-за окклюзий, тромбозов, кровоизлияний, деформированных просветов, извитой сосудистой сети и др. Показано *in vitro*, что PLGA-НЧ попадают в клетки глиомы с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза. Считается, что включение ЛВ в НЧ позволяет избежать его пиковых концентраций в крови и за счет этого снизить системную токсичность. PLGA-НЧ могут быстро высвободить достаточную дозу Докс за короткое время, а затем поддерживать его концентрацию. Через 15 до 30 минут после внутривенного введения Докс-PLGA значительно увеличивается общая концентрация Докс в плазме крови, уменьшается стационарный объем, распределение и клиренс, а также увеличивается концентрация в плазме крови, по сравнению со свободной формой Докс.

Одна из проблем экспериментальной онкологии – разработка адекватных, релевантных моделей опухолей на лабораторных животных, с целью воссоздания максимально близкой к человеку биологии опухоли в эксперименте. Лабораторные грызуны являются основным модельным организмом опухолевого процесса изучаемой в научных и доклинических исследованиях, опухолевые модели экономически целесообразны, хорошо воспроизводимы. ГБ 101.8 крысы хорошо изученная модель,

гистологически схожая с ГБ человека – высококлеточная опухоль, 4 степени злокачественности, инфильтративного характера роста, с высокой митотической активностью, некрозами и пролиферацией сосудистой сети.

Исследования патоморфологических и молекулярно-биологических особенностей ГБ при введении наносомальных форм ЛВ, в том числе Докс, не до конца изучены и требуют проведения исследований механизмов повышения противоопухолевой эффективности наноформ ЛВ и снижения их токсичности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Лабораторные животные

Работа выполнена на 94 половозрелых самцах крыс Вистар (питомник «Столбовая», Россия), массой тела 180-200 г. Животных перед началом эксперимента выдерживали на карантине в течение 14 суток, содержали по 5 особей в клетке типа Т4, в условиях вивария при естественном освещении при комнатной температуре, относительной влажности 35-65 %, доступ к корму и воде *ad libitum*. 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), правилами биоэтики, утвержденными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, 1986), 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). Животные с ГБ 101.8 без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA были разделены на группы (табл. 2): для оценки продолжительности жизни и выживаемости (n=34), определения размеров, оценки морфологии опухоли и токсического действия (гистология и биохимия) ЛП на печень и сердце (n=27). У интактных животных также исследовали нефротоксичность Докс и Докс-PLGA (n=25).

Количество животных в экспериментальных группах

Группы животных	Количество животных в группе		
	Определение продолжительности и жизни, выживаемости	Определение размеров и изучение морфологии глиобластомы 101.8, гепато-кардиотоксичности препаратов	Определение нефротоксичности препаратов
1. Без введения лекарственных препаратов	15	7	5
2. Введение доксорубицина, (Докс)	10	9	10
3. Введение доксорубицина-PLGA, (Докс-PLGA)	9	11	10
Всего животных	34	27	25

2.2 Модель экспериментальной глиобластомы 101.8

Глиобластома 101.8 крысы – оригинальная модель злокачественной диффузной глиомы головного мозга (рис. 6), получена в ФГБНУ «НИИ морфологии человека», путем интракраниального введения крысам ДМБА в мозжечок (Яблоновская Л. Я. с соавт., 1967).



Рисунок 6. Головной мозг крысы с глиобластомой 101.8. Асимметрия полушарий мозга, правое заметно увеличено за счет опухоли. На месте подсадки виден рост опухоли – округлая темно-красная зона

Тканевые фрагменты опухоли хранятся в жидком азоте, опухоль поддерживается методом интракраниальных пассажей крысам Вистар (Халанский А.С. с соавт., 2013). Воспроизводимость опухоли составляет 95-100%. По морфологическим характеристикам ГБ 101.8 является низкодифференцированной диффузной астроцитомой с высокой плотностью опухолевых клеток на единицу площади, высокой митотической активностью, фокальной пролиферацией кровеносных сосудов и псевдопалисадообразными некрозами. По морфологической картине ГБ 101.8 сходна с ГБ человека (рис. 7).

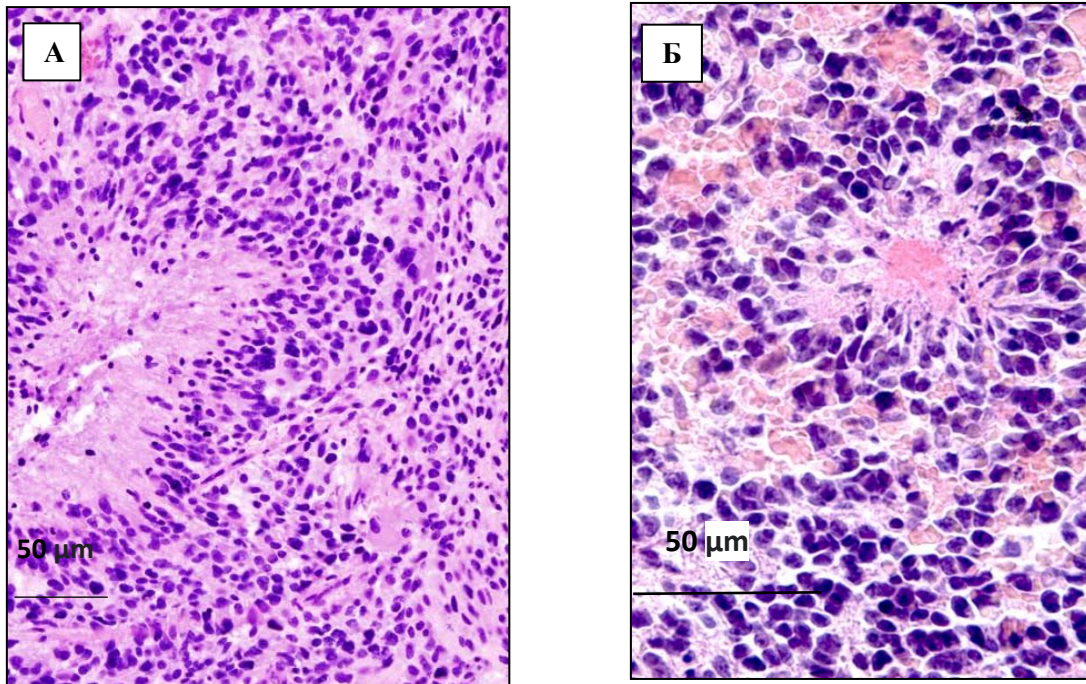


Рисунок 7. Морфологическая структура глиобластомы человека (А) и глиобластомы 101.8 крыс (Б). Псевдопалисадообразные некрозы, ядерный и клеточный полиморфизм клеток опухоли. Окраска гематоксилином и эозином.

2.3 Исследуемые фармакологические препараты

Доксорибуцина гидрохлорид (Докс), лиофилизат для внутривенного введения (Sicor SpA, Italy, серия 7000A00 0313).

Доксорибуцина гидрохлорид в наночастицах из сополимера молочной и гликолевой кислот (Докс-PLGA), лиофилизат для внутривенного введения. Сополимер молочной и гликолевой кислот 50:50 (PLGA, Evonik Röhm GmbH, Германия). Содержание Докс 1,43 мг/флакон. Поливиниловый спирт 10 мг/флакон, маннит 50 мг/флакон. Средний размер частиц после ресуспендирования $110,0 \pm 0,9$ нм. Соотношение PLGA: Докс в лиофилизате 10:1 (по массе), около 80 % Докс связано с полимером. Частицы Докс-PLGA имели сферическую форму, гладкую поверхность и отрицательный заряд. Данная серия препарата также содержит свободный Докс (ООО «Технология лекарств», Россия). Эта наносомальная форма Докс была предоставлена в рамках соисполнения НИР-4 от 03.09.2013, 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).

Во всех исследованиях в качестве растворителя Докс и Докс-PLGA использовали воду для инъекций, а при оценке нефротоксического эффекта 1% водный раствор плуроника P188. За 20 минут до введения животным готовили рабочий раствор исследуемых препаратов, для этого к содержимому флакона добавляли воду для инъекций или 1% водный раствор плуроника P188, оставляли на 20 минут, перед введением готовый раствор осторожно встряхивали (избегая вспенивания). Препараты Докс и Докс-PLGA для оценки их эффективности, лекарственного патоморфоза и изучения кардио- и гепатотоксичности при ГБ 101.8 у крыс 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 дозе 1,75 мг/кг (рис. 7А, 7Б).



Рисунок 7 А. Схема эксперимента по оценке противоопухолевого эффекта терапевтических доз Докс и Докс-PLGA у животных с глиобластомой 101.8



Рисунок 7 Б. Схема эксперимента по оценке токсического действия терапевтических доз Докс и Докс-PLGA у животных с глиобластомой 101.8

2.4 Методы экспериментальной онкологии

2.4.1 Ревитализация глиобластомы 101.8 крысы

Банк опухолевой ткани ГБ 101.8 хранили в жидком азоте. Все манипуляции с опухолевым материалом проведены в соответствии с общепринятыми протоколами работы с культурами/штаммами животных клеток (Фрешни Р.Я., 2010). Ревитализацию опухоли осуществляли с периодичностью не менее одного раза в 6 месяцев. Морфологическая идентичность ГБ 101.8 крысы с ГБ человека, показана в ряде работ (Steiniger S.C. et al., 2004; Hekmatara I. et al., 2009; Gelperina S.E. et al., 2010; Wohlfart S. et al, 2011).

Ампулу со штаммом ГБ 101.8, взятую из криохранилища, помещали в емкость с теплой (39⁰ С) водой для быстрого размораживания, центрифугировали 5-7 минут при 1-2 тыс. об/мин. (250 g). Супернатант удаляли, осадок набирали в шприц с широкой иглой и вводили интракраниально по 40 мкл каждому животному (~8-10 x 10⁵ клеток).

2.4.2 Интракраниальная трансплантация глиобластомы 101.8 крысы

Для ревитализации клеток и поддержания штамма опухоли было использовано 8 крыс. Перед трансплантацией животных наркотизировали внутривенным введением препарата Золетил 50 (Virbac, Франция) 5-10 мг/кг массы тела с премедикацией атропином (ОАО «Дальхимфарм», Россия) 0,05 мг/кг массы тела. Кожу головы обрабатывали 70% спиртом и 5% спиртовым раствором йода. Открытый разрез кожи обрабатывали 1% раствором гидроксиметилхиноксалиндиоксида (Диоксидин, АО «Новосибхимфарм», Россия). Трансплантацию опухоли в головной мозг производили стерильно через трепанационное отверстие в теменной кости черепа на расстоянии 2 мм справа от сагиттального шва (Sutura sagittalis) и 2 мм каудально от венечного шва (Sutura coronalis), которое наносили зубо-врачебным шаровидным бором диаметром 1,5 мм. Таким образом, измельченную ткань опухоли подсаживали троакаром на глубину 4 мм в область полосатого тела. Края кожной раны сближали и накладывали швы хирургической шелковой нитью.

2.4.3 Экспериментальные группы животных

Экспериментальные животные с имплантированной ГБ 101.8 были разделены на 6 групп (табл. 2). В одной группе (n=34) оценивали продолжительность жизни и выживаемость (100 дней наблюдения – длительная ремиссия) животных, во второй группе – лекарственный патоморфоз опухолей с помощью морфологических, морфометрических, гистохимических, иммуноферментных, иммуногистохимических методов, а также определяли кардио- и гепатотоксичность Докс и Докс-PLGA с помощью морфологического и биохимического методов (n=27). Для изучения нефротоксичности при введении животным Докс и Докс-PLGA применяли, морфологические, гистохимические и ультраструктурные (ПЭМ) методы, крысы также были разделены (табл. 2) на 3 группы (n=25).

2.4.4 Исследование продолжительности жизни и выживаемости животных с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

В соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012), проводили оценку противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %) и гибели или выживаемости всех животных (100 сут, полная ремиссия). Определяли среднюю продолжительность жизни (СПЖ, сут) в группе и вычисляли увеличение продолжительности жизни (УПЖ%) и Т/С:

$$\text{УПЖ \%} = (\text{СПЖ опыта} - \text{СПЖ контроля}) / \text{СПЖ контроля} \times 100;$$

$$\text{Т/С\%} = (\text{СПЖ опыта} / \text{СПЖ контроля}) \times 100.$$

Т(терапия)/С(контроль) – данное отношение используется в случаях, когда имеется стимуляция роста опухоли и во всех случаях лечения развившейся опухоли. Минимальные значения Т/С для животных с асцитными и солидными опухолями составляют: Т/С \geq 150%, УПЖ \geq 50% (табл. 3).

Полуколичественный критерий (Т/С) оценки активности исследуемого лекарственного препарата (Миронов А.Н., 2012):

Т/С	<125%	
	125-160 %	
	161-200 %	
	201-300 % или 161-200 % при однократном введении	+
	> 200 % + ПР или излечение <50 % (ПР – полная ремиссия, отсутствие признаков опухоли в течении 100 суток)	++
	>300 % + ПР или излечение >50 % или <50 % при однократном введении	+++

2.5 Гистологические методы исследования

2.5.1 Гистологические методы исследования глиобластомы 101.8, печени, сердца и почек: фиксация препаратов, получение серийных ступенчатых срезов, окраски

Для гистологического исследования ГБ 101.8, печени и сердца животные были выведены из эксперимента передозировкой (25 мг/кг) Золетил-100 (Virbac, Франция) на 14-е сут после имплантации опухоли (6-е сут после окончания введения препаратов). Кровь из шейных вен забирали в вакуумные пробирки Improvacuter для исследования сыворотки с активатором свертывания, через 20 минут кровь центрифугировали 7 минут при 1500 (250 g) об/мин., сыворотку крови отбирали в отдельные пробирки, замораживали и хранили при -20⁰ С. Животных для гистологического исследования почек выводили из эксперимента на 8-й и 21-й дни передозировкой (25 мг/кг) Золетил-100 (Virbac, Франция). После вскрытия черепной коробки головной мозг выделяли целиком, у животных забирали сердце и правую долю печени. У крыс без ГБ 101.8 для исследования нефротоксичности фармакологических препаратов выделяли одну почку и разрезали ее продольно пополам. Препараты головного мозга и одного фрагмента почки фиксировали в 10% нейтральном формалине (Biovitrum, Россия), препараты сердца и печени фиксировали в жидкости Буэна, проводили по спиртам возрастающих

концентраций и ксилолам в аппарате Tissue TEK 5 (Sakura, Япония). Обезвоженные образцы заключали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC-5 (Sakura, Япония). Серийно-ступенчатые гистологические фронтальные срезы головного мозга толщиной 7 мкм, сердца и печени 7 мкм, почек 5 мкм изготавливали на микротоме модели Microm HM 340 (ThermoScientific, США). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином (Меркулов Г.А., 1969). Для заключения гистологических препаратов использовали синтетическую монтирующую среду (Biovitrum, Россия).

2.5.2 Просвечивающая электронная микроскопия почек: фиксация препаратов, получение полутонких срезов, окраска

Второй фрагмент почки использовали для оценки ультраструктурных изменений. Вырезали кусочки тканей почки на границе коркового и мозгового вещества размерами не более 3х3х3 мм, фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде на фосфатном буфере (0,1М рН 7,3) в течение 2 часов. После двукратной промывки в 0,1М фосфатном буфере, фиксировали в 1% растворе OsO₄ в течение 60 минут при температуре +4⁰С. Далее проводили обезвоживание в спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь Epon-Araldite (Electron Microscopy Sciences, США). Полутонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме 8800 Ultrotome III (LKB, Швеция) с помощью стеклянных ножей, окрашивали метиленовым синим и исследовали их под световым микроскопом. Выбирали интересующую область, затачивали эпоновый блок и изготавливали ультратонкие срезы, которые монтировали на сетки для электронной микроскопии. Исследование образцов проводили на просвечивающем электронном микроскопе TEM Libra120 (Carl Zeiss, Германия).

2.5.3 Гистологическое исследование препаратов головного мозга

При гистологическом исследовании проводили оценку всех изготовленных препаратов на качественном уровне. Просмотрено от 6 до 18 стекол, по 2-3 среза на каждом стекле для каждого животного (в зависимости от размеров опухоли количество ступенчатых и серийных срезов было различным) при увеличении 100, 200, 400 и 1000. При описании препарата обращали внимания на следующие параметры: наличие и размеры опухоли; локализация; прорастание через эпендиму в полость желудочка мозга; характер роста опухоли; клеточный полиморфизм; состояние перитуморальной зоны

головного мозга; наличие и размеры очагов некроза и «псевдопалисадов»; наличие, размеры кровоизлияний, глиальных рубцов и отложений гемосидерина в них; состояние сосудов: форма их просвета, толщина сосудистых стенок; наличие сосудистых розеток; наличие многоядерных гигантских клеток – «терапевтические гиганты».

Для характеристики процессов клеточной пролиферации и гибели в периферических зонах опухолей проводили оценку количества митозов и клеток с признаками гибели на стандартной площади гистологического среза (65025 мкм²; x400). В зависимости от размера опухоли подсчет проводили в 5-10 полях зрения.

В случае, если опухоль не была обнаружена, описывали зону интракраниальной трансплантации опухоли, в которой проводили поиск опухолевых клеток. На основании гистологического описания опухолей мозга каждого животного было сделано гистологическое описание по группе животных.

Для объективизации результатов морфологического исследования был проведен морфометрический анализ срезов головного мозга всех животных.

2.5.4 Гистологическое исследование препаратов миокарда, печени и почек

При гистологическом исследовании проводили оценку всех изготовленных препаратов на качественном уровне.

При описании гистологических препаратов миокарда обращали внимания на следующие параметры: лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация в рыхлой соединительной ткани, поперечная исчерченность кардиомиоцитов, их повреждение, состояние сосудов гемомикроциркуляторного русла, некрозы и межочечный отек.

При морфологическом исследовании печени у крыс с ГБ 101.8 обращали внимание на морфологические изменения гепатоцитов, количество неэпителиальных клеточных элементов, в том числе клеток Купфера, и лимфоцитов.

2.6 Морфометрическое исследование размеров глиобластомы 101.8

Для количественной оценки объема опухоли производили ее 3D-реконструкцию в соответствии с рекомендациями ряда авторов (Funnell W.R.,2006; Marcos R.,2012; Овчаренко В.В., 2015). Для анализа брали каждый 15-й серийно-ступенчатый гистологический фронтальный срез (то есть шаг составлял 105 мкм) головного мозга толщиной 7 мкм, окрашенный гематоксилином и эозином. Получали электронные копии

изображений срезов, используя планшетный сканер Epson Perfection V700 Photo (Япония) при оптическом разрешении 800 dpi (рис. 8). Для дальнейшей калибровки изображений одновременно со срезами сканировали линейку. Полученные фотографии срезов были ориентированы в стандартной позиции при помощи координатных линий в программе Photoshop CS5 (Adobe Inc., США). Были получены серии изображений срезов головного мозга с опухолью (рис. 9). Далее в каждом срезе (от 16 до 65 срезов) обводили контуры опухоли (рис. 10) и вводили данные в программу Image-Pro Premiere 3D (Media Cybernetics, США). После программной обработки данных получали объемный вид (3D реконструкцию) опухоли (рис. 11). Для количественной оценки размеров опухоли вычисляли размер вокселя (V_x) по формуле: $V_x = X \times Y \times Z$, где X и Y – размер пикселя в миллиметрах, а Z – шаг между срезами (толщина среза + расстояние до следующего среза в миллиметрах).



Рисунок 8. Сканированные гистологические серийно-ступенчатые фронтальные срезы головного мозга. Окраска гематоксилином и эозином



Рисунок 9. Серия изображений фронтальных срезов головного мозга крысы с глиобластомой 101.8, подготовленная для получения 3D-изображения

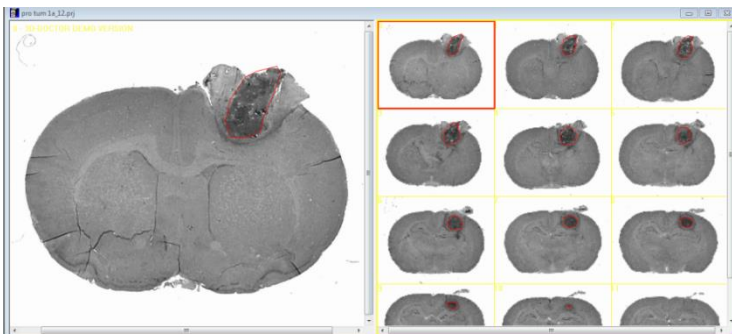


Рисунок 10. Морфометрический анализ. Препаративный этап формирования 3D-изображения опухоли

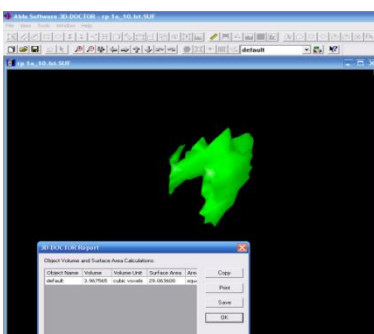


Рисунок 11. Морфометрический анализ. Реконструированное 3D-изображение опухоли с оценкой ее объема

2.7 Оценка противоопухолевого эффекта исследуемых препаратов на модели глиобластомы 101.8 крыс на основании подсчета торможения роста опухоли

В соответствии с рекомендациями по доклинической оценке лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012), был вычислен индекс торможения роста опухоли (ТРО) и Т/С по формулам:

$$\text{ТРО (\%)} = (V \text{ контроля} - V \text{ опыта}) / V \text{ контроля} \times 100;$$

$$\text{Т/С\%} = (V \text{ опыта} / V \text{ контроля}) \times 100;$$

V – средний объем опухоли в группе наблюдения (мм³); Т – получившие лечение животные; С – животные без лечения. Т/С – величина, обратная ТРО, используется в случаях, когда имеется стимуляция роста опухоли и во всех случаях лечения животных с развившейся опухолью. Минимальные значения ТРО трех обязательных для изучения чувствительности к препарату опухолей: ТРО \geq 70%, Т/С \leq 30%. Минимальные значения для единственной чувствительной к препарату опухоли из спектра обязательных для изучения опухолей: ТРО \geq 90%, Т/С \leq 10% (табл. 4).

Полуколичественная оценка ингибирующего эффекта – ТРО (торможение роста опухоли) препарата на опухоль животного (Миронов А.Н., 2012):

ТРО	< 20%	0
	< 20%-50%	±
	< 51-80%	+
	< 81-90%	++
	< 91-100% + < 50% ПР или излечения	+++
	< 91-100% + > 50% ПР или излечения	++++

Для более объективной и точной оценки были использованы показатели объемов опухолей крыс (мм³), полученные 3D реконструкцией в программе Image-Pro Premiere (Media Cybernetics, США).

2.8 Оценка митотической активности, клеток с признаками гибели и коэффициента клеточного обновления глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Для исследования кинетики опухолевого роста нами были оценены митотически делящиеся и гибнущие клетки в ГБ 101.8 на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. На основе подсчета митозов и клеток с признаками гибели вычисляли интегративный показатель – коэффициент клеточного обновления (ККО). Проллиферативная активность клеток опухоли также была оценена при иммуногистохимической окраске с антителами к Ki67 у животных всех экспериментальных групп проводили в периферических отделах опухоли, где отсутствовали некрозы (Лушников Е.Ф., 1976; Лушников Е.Ф., Абросимов А.И., 2001; Казанцева И.А., Гаганов Л.Е., 2014).

2.8.1 Исследование митотической активности, клеток с признаками гибели и коэффициента клеточного обновления глиобластомы 101.8 у животных исследуемых групп в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином

Для изучения кинетики опухолевого роста ГБ 101.8 у животных без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA проводили подсчет в 5-10 полях зрения на стандартной

площади (65025 мкм, х400) гистологического среза, окрашенного гематоксилином и эозином, абсолютного числа митозов и клеток с морфологическими признаками гибели, с последующим вычислением коэффициента клеточного обновления (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.

2.8.2 Иммуногистохимическое исследование Ki67-позитивных клеток в глиобластоме 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием иммунопероксидазного метода. Для иммуногистохимического исследования использовали серийные гистологические срезы головного мозга крыс Вистар с визуально определяемыми зонами опухолей. Гистологические срезы монтировали на стеклах Super Frost plus (Mentzel, Германия). Иммуногистохимическое окрашивание пролиферирующих клеток опухоли проводили с антителами к Ki67 (Rabbit polyclonal Anti-Ki67 antibody, ab15580, Abcam) в разведении 1 мкг/мл, срезы инкубировали во влажной камере при +4 С⁰ в течение ночи. Срез был предварительно обработан кипячением с цитратно-натриевым буфером (рН6) в течение 20 минут. В качестве вторичных использовали универсальную пероксидазную полимерную систему N-Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei biosciences, Япония), хромоген – DAB (Dako, Дания). Контролем реакции были гистологические срезы опухолей, в которые при постановке ИГХ реакций антителами к Ki67 не обрабатывали. В каждом исследовании препараты после достижения оптимальной интенсивности окрашивания промывали водой для прекращения реакции, докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам. Подсчет Ki67- позитивных клеток проводили на 1000 клеток ГБ 101.8 при увеличении 400.

2.8.3 Иммуногистохимическое исследование GFAP-позитивных структур в глиобластоме 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием иммунопероксидазного метода. Для иммуногистохимического исследования использовали серийные гистологические срезы головного мозга крыс Вистар с визуально определяемыми зонами опухолей. Гистологические срезы монтировали на стеклах Super Frost plus (Mentzel, Германия). Иммуногистохимическое исследование глиального фибриллярного кислого белка – GFAP проводили с антителами к GFAP (Dako, Дания) в разведении 1 мкг/мл, и системой детекции Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences inc., Япония); хромоген – DAB (Dako, Дания). Срезы инкубировали во влажной камере при +4 С⁰ в течение ночи. Срез был предварительно обработан кипячением с цитратно-натриевым буфером (рН6) в течение 20 минут. Контролем реакции были гистологические срезы опухолей, в которые при постановке ИГХ реакций антителами к GFAP не обрабатывали. В каждом исследовании препараты после достижения оптимальной интенсивности окрашивания промывали водой для прекращения реакции, докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

2.9 Оценка кровеносных сосудов в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

2.9.1 Определение количества кровеносных сосудов в глиобластоме 101.8 у животных исследуемых групп при гистохимической окраске изолектином В4

Кровеносные сосуды в ГБ 101.8 выявляли с помощью гистохимической реакции эндотелиальных клеток с изолектином В4 – лектин из растения *Griffonia simplicifolia*, он специфично связывается с остатками α-d-галактозы в гликоконъюгатах на поверхности клеток и мембранах аппарата Гольджи эндотелиальных клеток грызунов и селективно их окрашивает (Vector Lab, США). Реакцию проводили в соответствии с протоколом производителя. Оценивали количество сосудов в поле зрения в зависимости от размера опухоли (не менее 3-15 полей зрения на животное, х 200).

2.9.2 Иммуноферментный анализ фактора роста сосудов А (VEGF А) в сыворотке крови крыс с глиобластомой 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

VEGF А является наиболее распространенным и важным медиатором ангиогенеза, сверхэкспрессируется, как и его рецептор, при ГБ и вызывает неограниченную васкуляризацию опухоли (Eguchi R. et al, 2022).

Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли VEGF А (Bender MedSystems GmbH, Австрия) у животных экспериментальных групп. Спектрофотометрию проводили на микропланшетном ридере (Anthos 2010, Австрия) при длине волны 495 нм.

2.10 Биохимическое исследование сыворотки крови крыс с глиобластомой 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

В сыворотке крови оценивали активности ферментов: аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинфосфокиназы (КФК) кинетическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе Mindray Bs-120 (Китай) с использованием наборов «Human GmbH» (Германия).

2.11 Оценка нефротоксичности у крыс терапевтических доз препаратов Докс и Докс-PLGA гистохимическим методом

Оценку целостности щеточной каемки в эпителии проксимальных канальцев почек у интактных животных и животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA, проводили на гистологических срезах с помощью ШИК-реакции. Для определения тяжести поражения проксимальных канальцев почки оценивали долю канальцев со слабой ШИК-реакцией и разрушением щеточной каемки. В каждом наблюдении в гистологических препаратах оценивали 500 поперечно срезанных канальцев.

2.12 Статистический метод

Статистическая обработка результатов была проведена с использованием программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., США). Полученные данные проверены на соответствие нормальному распределению методом Колмогорова-Смирнова, который показал, что для характеристики вариационных рядов и сравнения экспериментальных групп необходимо использовать непараметрическую статистику. Оценку выживаемости

проводили непараметрическим методом Каплана-Мейера. Выживаемость изучали по методу Каплана-Мейера (Kaplan E.L., Meier P., 1958), на оси абсцисс отмечали сутки наблюдения, а на оси ординат – процент выживших животных. Графическая кривая Каплана-Мейера отражает пропорцию животных, у которых ожидаемое событие (смерть) не произошло к определенному моменту времени. Когда исследуемое животное погибало, производили перерасчет пропорции оставшихся в эксперименте выживших животных, что отображается «ступенькой» вниз на кривой. Для характеристики центральных тенденций объемов опухолей использовали медиану Me (Q1-25%; Q3-75%). Для сравнения экспериментальных групп была применена непараметрическая статистика множественного сравнения методом Краскела-Уоллиса и Коновера. Статистически значимо различающимися считали результаты, для которых значение составляло $\leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Результаты оценки общего состояния животных с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

После трансплантации тканей ГБ 101.8 в головной мозг крысам опухоли развивались у 100 % животных. Наблюдение за животными и определение их массы тела проводили ежедневно. За сутки масса тела животных увеличивалась на 5 ± 2 г. По данным литературы у половозрелых крыс Вистар средний прирост массы тела за сутки в этом возрасте составляет около 10 г (Макаров В.Г., 2013).

Клинические признаки интракраниального роста ГБ 101.8 проявлялись прогрессирующим снижением массы тела с последующим изменением состоянием шерстного покрова, поведенческих и двигательных реакций, парезами и параличами конечностей. За 12-14 часов до гибели у животных наблюдали окрашенный в красно-коричневый цвет порфириновый выпот в области век и носовых отверстий. Для морфологического исследования животных выводили из эксперимента на 14-е сутки после трансплантации опухоли (или на 6-е сутки после окончания лечения). Гибель животных после трансплантации опухоли в группе без введения ЛП наступала на 14-21-е сутки. При вскрытии животных оценивали состояние внутренних органов, операционной раны и трепанационного отверстия, выделяли головной мозг, определяли наличие асимметрии больших полушарий, отека мозга и кровоизлияний.

Массометрию животных проводили ежедневно, определяли среднее значение массы тела (М) для животных групп без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA, до интракраниальной имплантации (М начальное) и перед выведением из эксперимента (М конечное, 14 сутки). У животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA, отмечена положительная динамика массы тела (табл. 5). Снижение массы тела обусловлено большим количеством факторов, в том числе токсичностью препарата, состоянием пищеварительной системы животного, его иерархическим положением в группе, в связи, с чем этот параметр может рассматриваться как вспомогательный для оценки течения заболевания, но не в качестве параметра, характеризующего специфическую активность препарата. Статистически значимое увеличение массы тела животных было обнаружено только у животных, которым вводили Докс ($p=0,04$).

Таблица 5

Масса тела животных с ГБ 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA, Ме (0,25; 0,75)

Экспериментальная группа	n	Масса тела до эксперимента, г	Масса тела животных на 14-е сутки после пересадки опухоли, г	Достоверность различий, p
1. Без введения лекарственных препаратов	15	185 (172; 199)	185 (181; 224)	0,12
2. Введение Докс	10	185 (175; 205)	210 (179; 222)	0,04
3. Введение Докс-PLGA	9	228 (197; 235)	247 (212; 260)	0,07

3.2 Оценка противоопухолевого эффекта терапевтических доз Докс и Докс-PLGA по продолжительности жизни и выживаемости животных с глиобластомой 101.8

Животных с ГБ 101.8 без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA (табл. 6) исследовали при оценки медианы, средней продолжительности жизни (СПЖ), увеличения продолжительности жизни (УПЖ), Т/С и выживаемости. Исследование проводили после гибели или 100-дневного дожития всех животных. На кривых Каплана-Мейера показаны различия выживаемости животных сравниваемых групп (рис. 12).

По сравнению с животными без введения ЛП ($p=0,002$) у животных, которым вводили Докс-PLGA, увеличилась продолжительность жизни и выживаемость. В группе животных, которым вводили Докс-PLGA, выжило 22% крыс, тогда как при введении Докс выживших животных не было (табл. 6, рис.12).

При оценке противоопухолевой эффективности введения крысам с ГБ 101.8 Докс-PLGA максимальное увеличение продолжительности жизни было у животных, которым вводили Докс-PLGA (84% по сравнению с крысами без введения ЛП и 59% которым вводили Докс). Средняя продолжительность жизни животных при введении Докс-PLGA была максимальной (табл. 6).

Таблица 6

Продолжительность жизни и выживаемость животных с ГБ 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Экспериментальные группы животных	N	N/ G+	N/ G-	СПЖ, сутки, M±s	Me (0,25;0,75) , сутки	УПЖ, (%)-1	УПЖ, (%)-2	T/C, %	
1. Без введения лекарственных препаратов	5	5	0	17±4	16 (14; 17)				
2. Введение Докс	0	0	0	22±3	19 (19; 26)	25		30	
3. Введение Докс-PLGA			2	32±10	34 (25; 37)	84	59	184	
Достоверность различий продолжительности жизни между группами					p ⁽¹⁻³⁾ = 0,002				

N – количество животных в группе; N/ G+ – количество животных с опухолью определяемой макро-и/или микроскопически; N/ G – количество животных без опухоли; СПЖ – средняя продолжительность жизни животных в группе наблюдения, без учета выживших животных, ± – стандартное отклонение; Me (0,25;0,75) – медиана выживаемости и квантили; T/C – T– (терапия), C– (контроль); T/C= (СПЖ_{терапия}/СПЖ_{контроль}) x 100% – данное отношение используется в случаях, когда имеется стимуляция роста опухоли и во всех случаях лечения развившейся опухоли. УПЖ (%) -1 – увеличение продолжительности жизни по сравнению с группой без введения ЛП; УПЖ (%) -2 – увеличение продолжительности жизни по сравнению с группой, которой вводили Докс

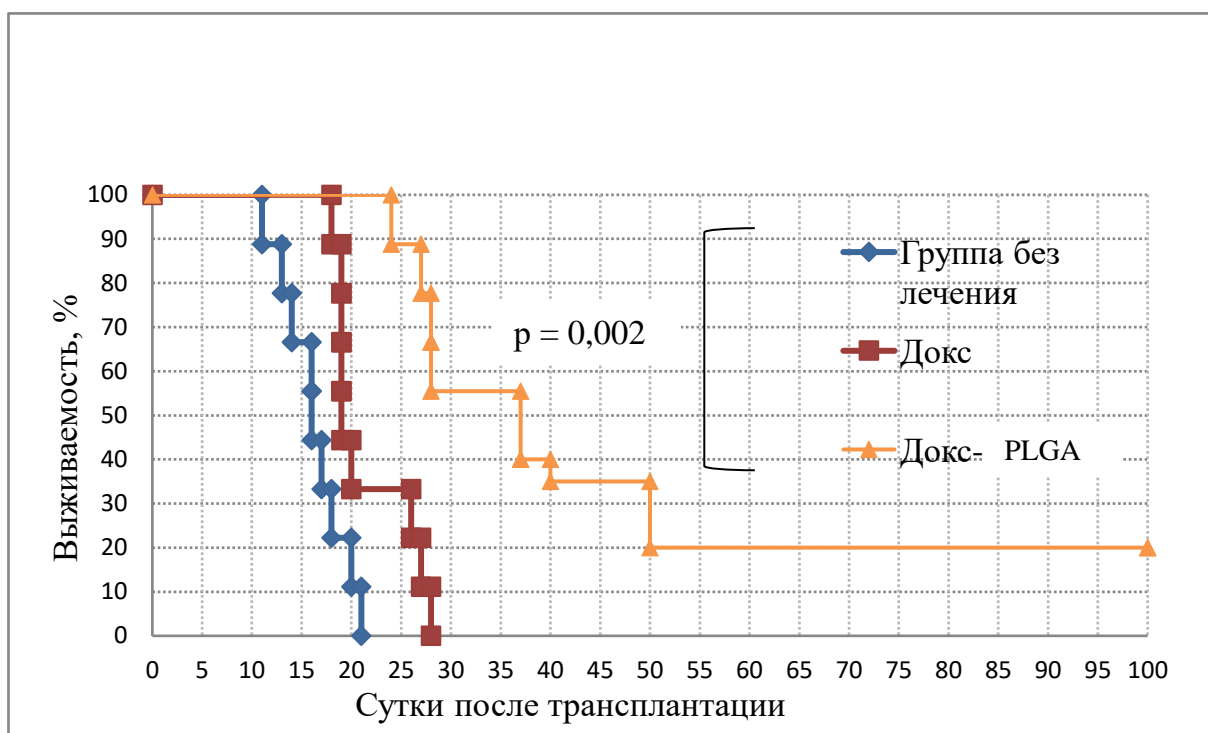


Рисунок 12. Кривые выживаемости Каплана-Мейера в течение 100 дней животных с глгобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов (n=15) и при введении терапевтических доз Докс (n=10) и Докс-PLGA (n=9)

Таким образом, на основании результатов исследования выживаемости и средней продолжительности жизни крыс Вистар с интракраниальной ГБ 101.8 при введении 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) – 25% по сравнению с животными без введения Докс. Наибольший эффект по СПЖ и УПЖ выявлен при введении крысам Докс-PLGA.

3.3 Волюмометрическая оценка размеров глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

3.3.1 Морфометрический анализ 3D изображений глиобластомы 101.8

Сканирование стандартных гистологических срезов головного мозга животных исследуемых групп было проведено на сканере EPSON PERFECTION V700 PHOTO (Япония) с разрешением 1200 dpi (рис. 13). Автоматическая сегментация оказалась невозможной из-за наличия в срезах структур, цветовая гамма которых была близка к цвету опухоли. В графическом редакторе Photoshop CS 6 (США) с использованием графического планшета EZ Canvas Navisis (Южная Корея) в каждом срезе контуры опухолей были обведены световым пером и перенесены в отдельные файлы.

Далее созданные файлы переносили в базу морфометрической программы Image-Pro Premiere (Media Cybernetics, S/N 809-10000-1010, США) и производили 3D реконструкцию и вычисление объема опухолей. По серийным ступенчатым гистологическим срезам мозга каждого животного экспериментальных групп при помощи метода 3D реконструкции были вычислены объемы опухоли (рис. 13-16, табл. 7).

Медиана объемов опухолей в группе крыс без введения ЛП была 95,8 мм³. У животных, которым вводили Докс, она составила 12,9 мм³, в группе Докс-PLGA - 2 мм³, а торможение роста опухоли (ТРО) и Т/С – 75,6% и 93,6 %; 13,5 и 2,1 соответственно (рис. 17, табл. 7).

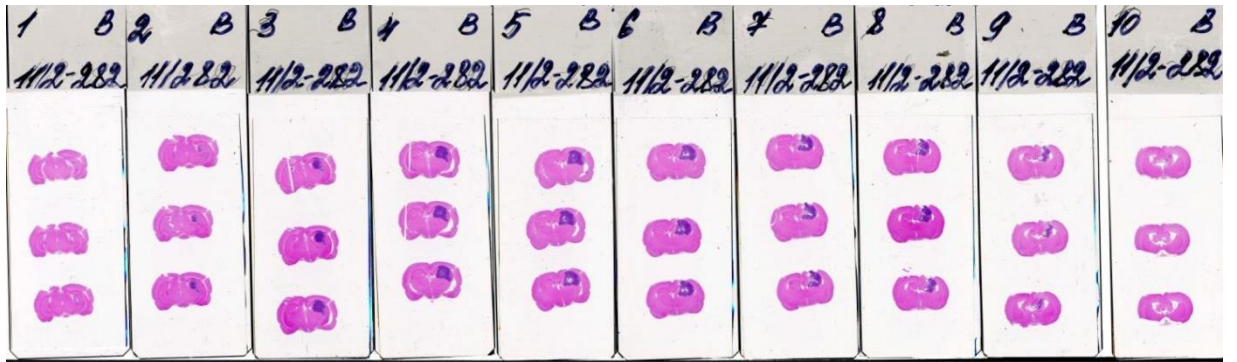


Рисунок 13. Результат сканирования серии препаратов. В графическом редакторе с использованием графического планшета в каждом срезе контуры опухолей были обведены световым пером и перенесены в отдельные файлы

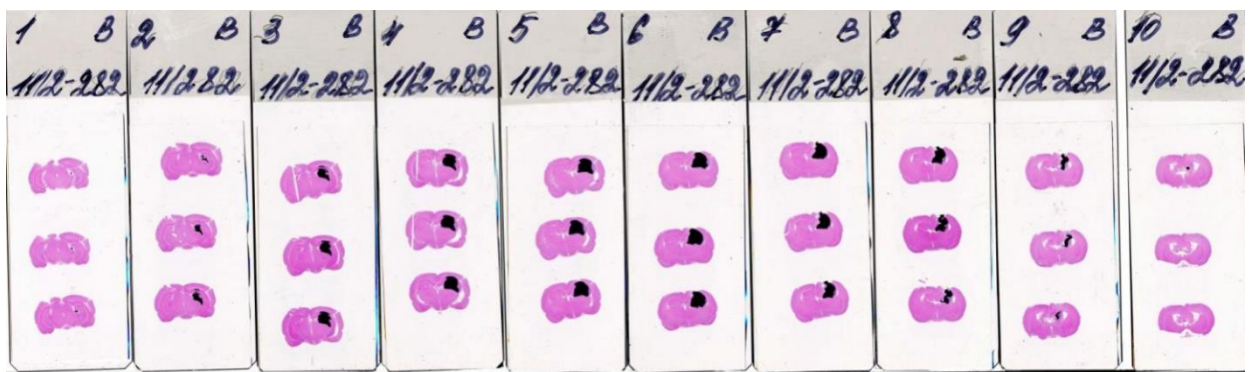


Рисунок 14. Результат обводки контуров опухоли



Рисунок 15. Реконструкция 3D-изображения опухолей, промежуточный этап

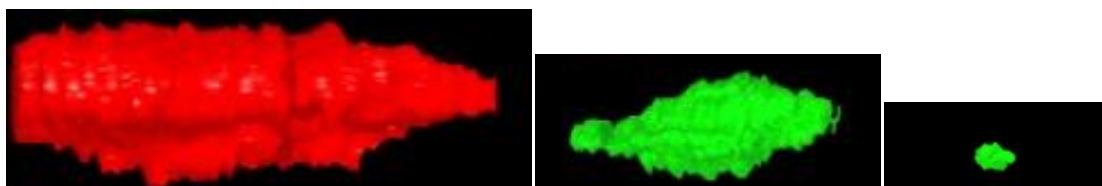


Рисунок 16. Образцы опухолей после 3D-реконструкции слева направо: большая, небольшая и микроопухоли

Результаты оценки противоопухолевого эффекта терапевтических доз препаратов на основании изменения медианы объема ГБ 101.8 крыс

Экспериментальные группы	n	Объем опухолей, мм ³ Me (0,25; 0,75)	ТРО*	Т/С %
1. Без введения лекарственных препаратов	7	95,8 (5,9; 114,6)		
2. Введение Докс	6	12,9 (9,2; 29,4)	75,6	13,5
3. Введение Докс-PLGA	11	2,0 (0; 1,9)	93,6	2,1
Достоверность различий между группами	Объемы опухолей: $p_{(1-3)} < 0,03$; ТРО: $p_{(2-3)} < 0,01$			

ТРО – торможение роста опухоли, Т/С- величина, обратная ТРО, используется в случаях, когда имеется стимуляция роста опухоли и во всех случаях лечения развившейся опухоли

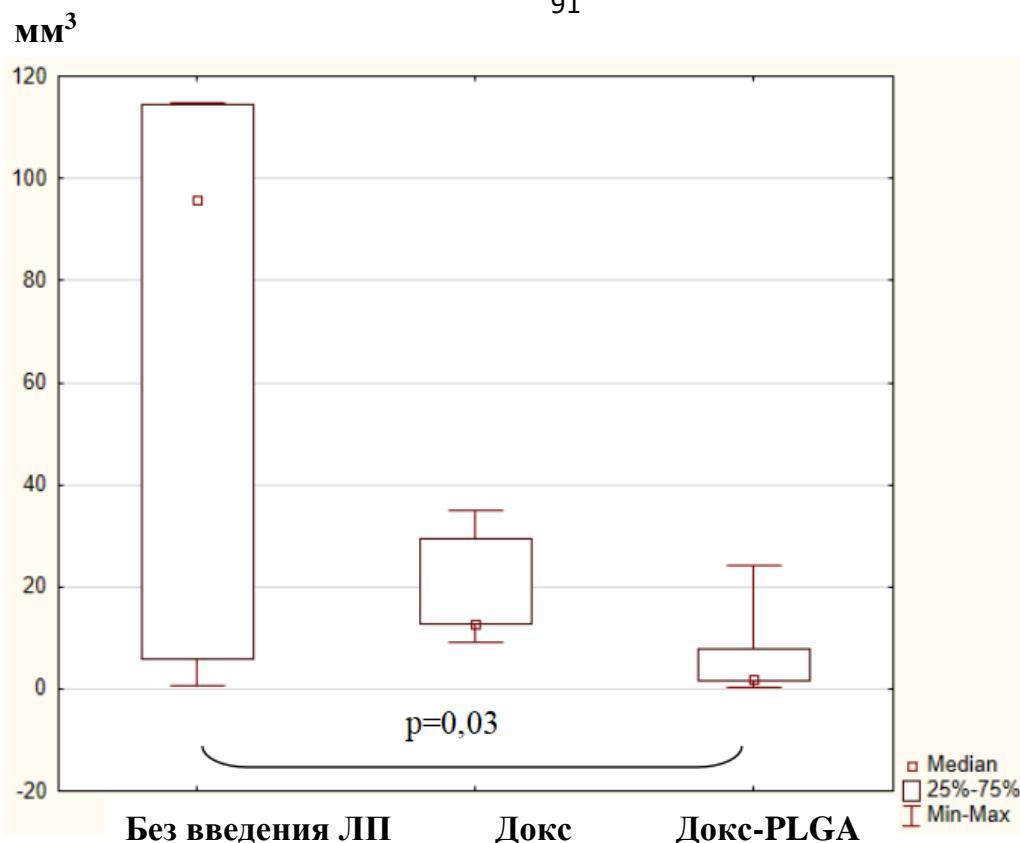


Рисунок 17. Объемы глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Таким образом, по результатам волюмометрической оценки размеров ГБ 101.8 показано, что по сравнению с животными без введения ЛП терапевтические дозы как Докс, так и Докс-PLGA тормозят рост опухолей в 7 и 47 раз, соответственно. При этом в группе животных, которым вводили Докс-PLGA, преобладали небольшие и микроопухоли.

3.3.2 Результаты морфометрической оценки вариабельности размеров глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

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. 16, 18). Для анализа вариабельности размеров опухолей животных условно разделили на три подгруппы: с микро (0-1 мм³), небольшими (2-10 мм³) и большими опухолями (11-120 мм³). Результаты анализа вариабельности размеров опухолей представлены на гистограмме (рис. 18). В

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

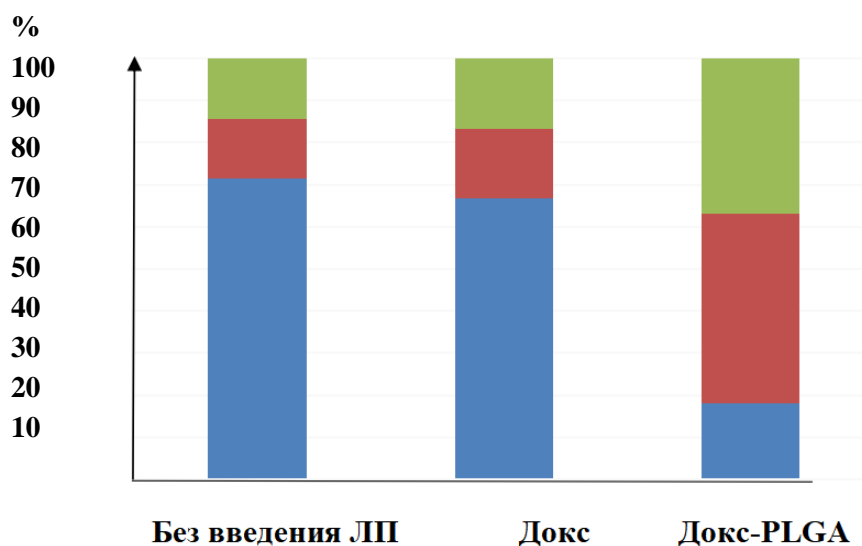


Рисунок 18. Вариабельность размеров глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA. ■ – микроопухоли (0 – 1 мм³), ■ – небольшие опухоли (2 – 10 мм³), ■ – большие опухоли (11 -120 мм³)

Таким образом, по данным волнометрической оценки размеров опухолей оба исследованных препарата оказывали выраженное терапевтическое действие, размеры опухолей были меньше, чем в группе без введения ЛП. На основании статистического анализа 3D-размеров опухоли ГБ 101.8 крыс, которым вводили Докс и Докс-PLGA, можно сделать вывод, что наибольший эффект подавления роста опухоли наблюдался при введении животным Докс-PLGA.

3.4 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 (рис. 19). Среди опухолевых клеток было много митотически делящихся (рис. 20). Встречались патологические митозы: концентрические митозы, полая метафаза, ассиметричные, колхициноподобные (рис. 20). Было много клеток с гомогенизацией или фрагментацией ядра – признаки гибели, клеток теней с нечеткими контурами, слабо базофильным ядром и вакуолизированной цитоплазмой (рис. 21 А-В). В некоторых опухолях у крыс, которым вводили Докс и Докс-PLGA, обнаружены многоядерные клетки «монстры» – от единичных в препарате и до 5-7 клеток в поле зрения при увеличении 400. Многоядерные клетки были крупными, содержали несколько ядер и локализовались среди опухолевых клеток (рис. 19 Б).

Опухоли были, в основном, относительно больших размеров, у части животных выявлены микроопухоли (рис. 22 А, Б). У большинства животных ГБ 101.8 прорастала стенку бокового желудочка головного мозга и частично заполняла его просвет (рис. 23 А, Б), а у части – эпендимальную выстилку не нарушала (рис. 23 В, Г).

Отмечался инфильтративный периваскулярный и перинейрональный рост опухоли в окружающие ткани головного мозга – опухолевые клетки в пограничной зоне образовывали скопления вокруг сосудов и нейронов с признаками гибели (рис. 24 В). Вокруг нейронов они нередко формировали железистоподобные структуры (рис. 24 А, Б).

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 (рис. 25 А-В), а также щелевидной формы с пролиферацией эндотелия с частично сформированной стенкой из эндотелия и хорошо визуализируемых волокон (рис. 25 А-В). Кроме того, сосуды образовывали группы по 3-5 - сосудистые розетки, определялись скопления пролиферирующих эндотелиальных клеток (рис. 25 В, Г). В опухолях обнаружены мелкие и обширные кровоизлияния, от единичных до множественных (рис. 22 А). Во многих опухолях,

особенно относительно больших размеров, определялись очаговые некрозы, которые в части опухолей были множественными, обширными и образовывали ландшафтообразные структуры (рис. 26 А), и среди них встречались некрозы с палисадообразным расположением опухолевых клеток (рис. 26 Б).

У части крыс в серийных ступенчатых срезах был выявлен только глиальный рубец, распространяющийся от коры головного мозга до паравентрикулярной зоны выявлен, в зоне рубца у отдельных животных были обнаружены единичные опухолевые клетки и их небольшие скопления (табл. 9, 10, рис. 27 А-Г). В перитуморальной зоне сетчатый, периваскулярный и перицеллюлярный отек, среди нейронов было много гиперхромных, а также с явлениями хроматолиза (рис. 24 В).

Выявленные при морфологическом исследовании особенности ГБ 101.8 у крыс соответствуют основным критериям ГБ человека (Авцын А.П. с соавт. 1988), которая также характеризуется высокой атипией опухолевых клеток, наличием большого количества кровеносных сосудов с образованием розеток и очаговой пролиферацией эндотелия, палисадообразных некрозов и кровоизлияний.

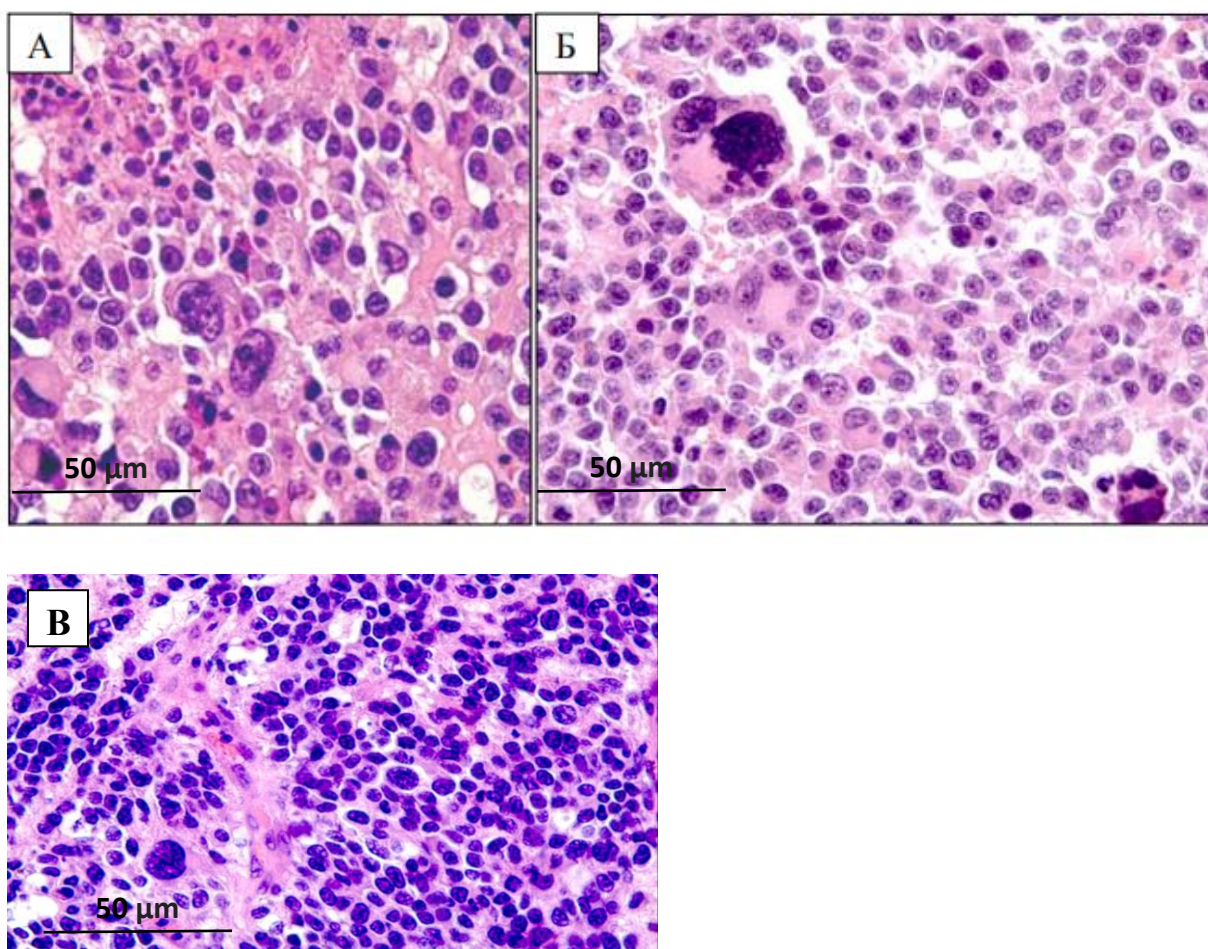


Рисунок 19. Морфологическая характеристика клеток глиобластомы 101.8 (А – при введении терапевтических доз Докс-PLGA; Б – при введении Докс; В – без введения лекарственных препаратов). А – Опухоль представлена полиморфными атипическими клетками с гиперхромными ядрами и узкими ободком цитоплазмы. Б – Среди атипических клеток многоядерные клетки «монстры». Окраска гематоксилином и эозином

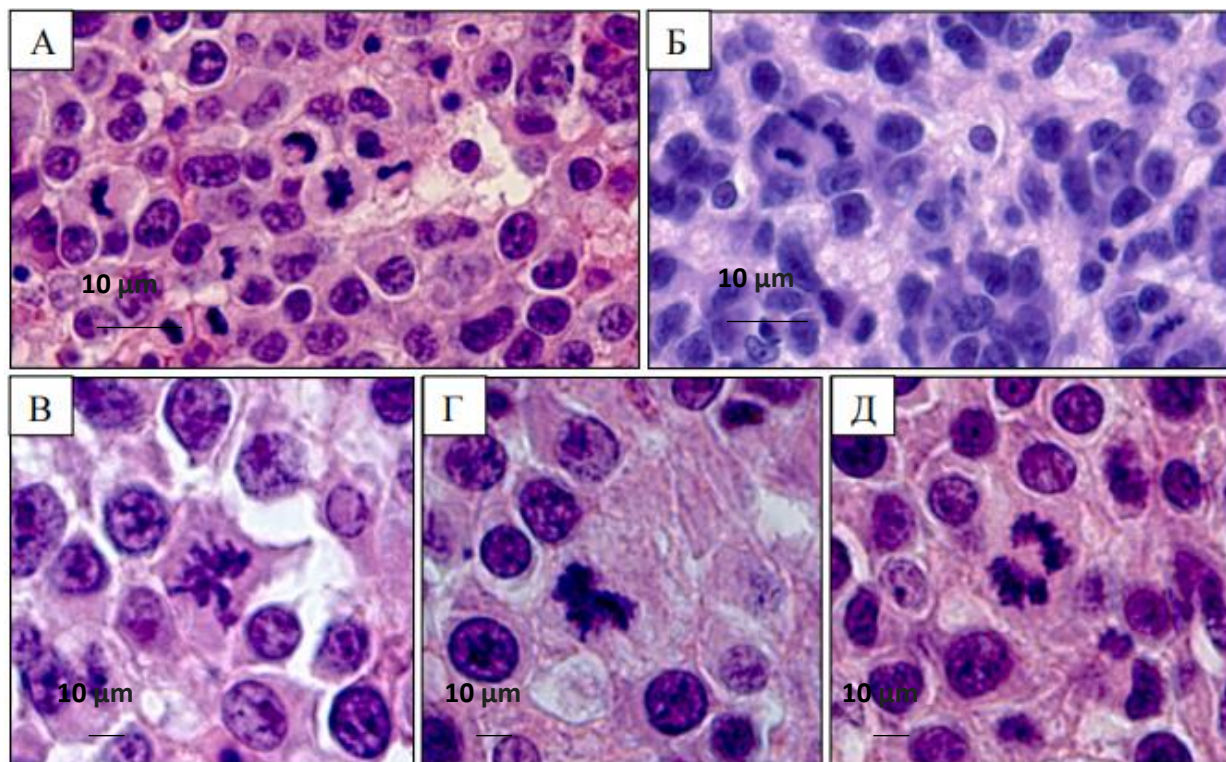


Рисунок 20. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8. Митозы (А, В-Д – при введении терапевтических доз Докс-PLGA; Б – при введении Докс). В – отставание хромосом в метафазе; Г – колхициновый митоз; Д – анафаза. Окраска гематоксилином и эозином

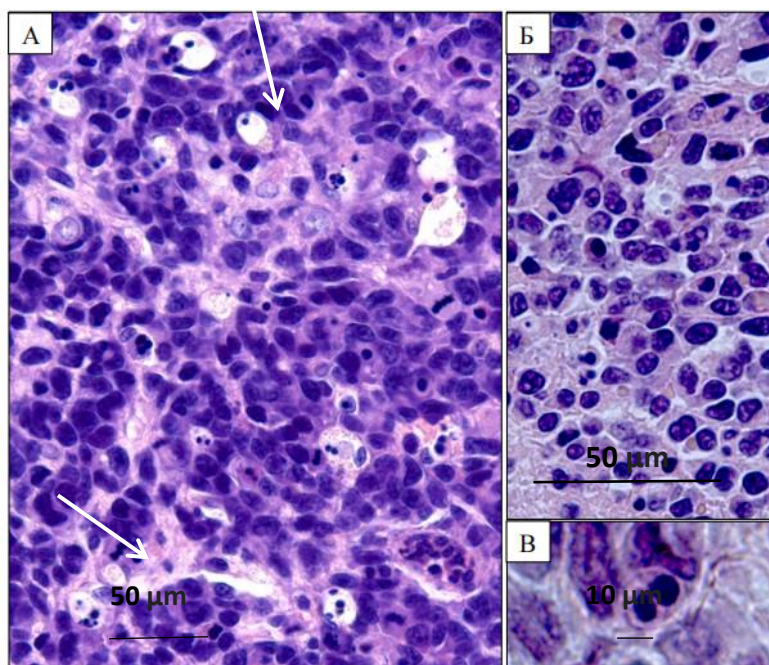


Рисунок 21. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8. Гибнущие клетки (А – при введении Докс; Б, В – при введении Докс-PLGA). Картина звездного неба (А), гибнущие клетки (А-В). Стрелки – гибнущие клетки. Окраска гематоксилином и эозином

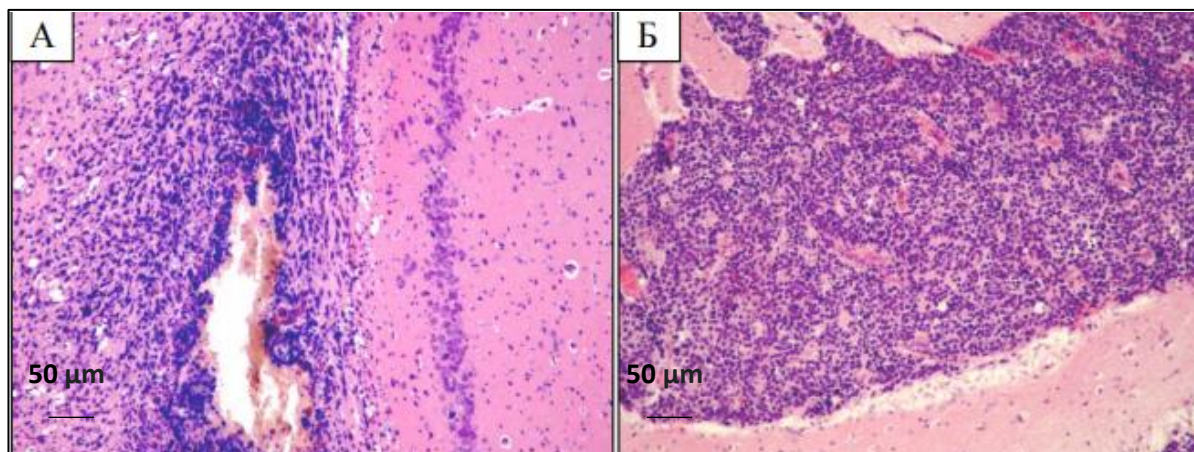


Рисунок 22. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8. Микроопухоли (А – при введении Докс-PLGA; Б – при введении Докс). А – Небольшая опухоль с обширным кровоизлиянием в центральной зоне. Б – Небольшая полиморфноклеточная опухоль с большим количеством сосудов. Окраска гематоксилином и эозином

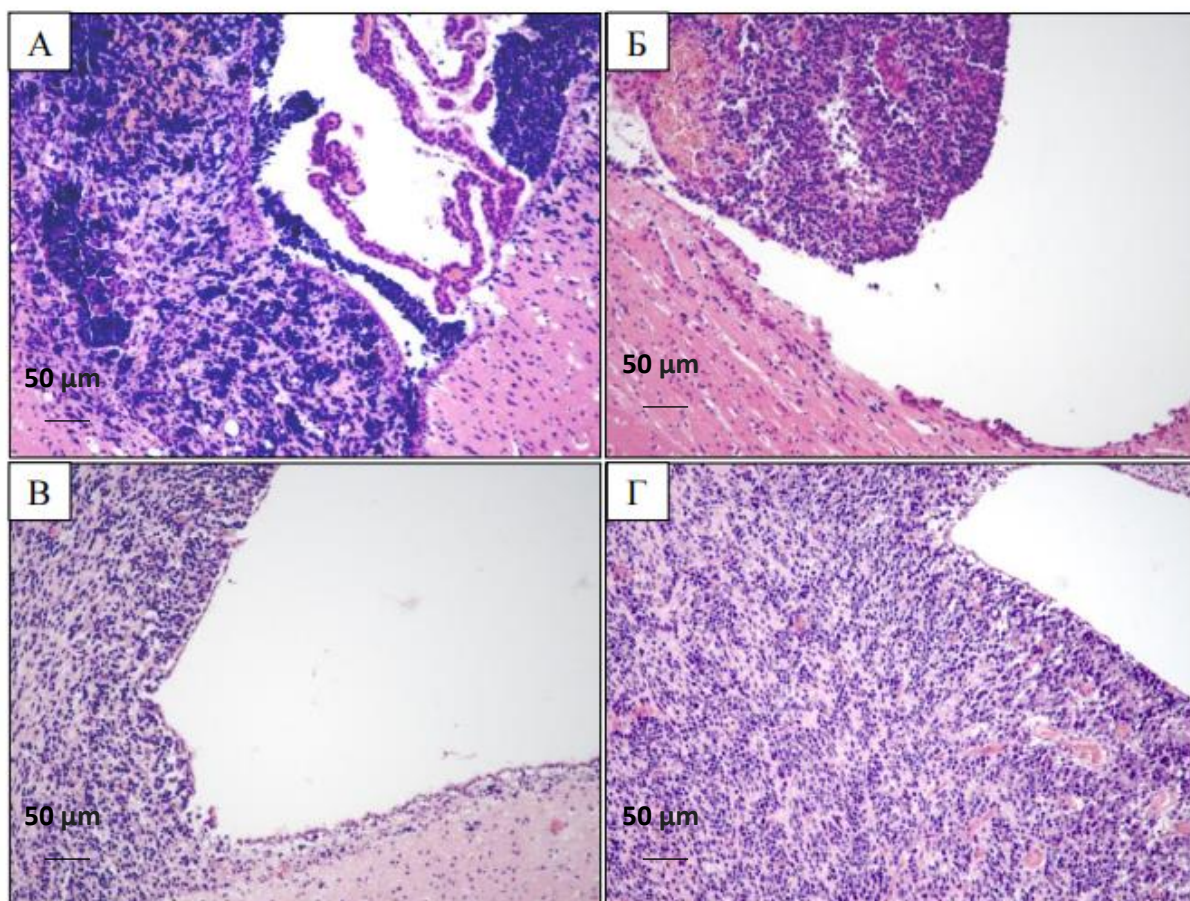


Рисунок 23. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 (при введении терапевтических доз Докс-PLGA – А, Б, В; Г– при введении Докс). А, Б – Опухоль прорастает стенку бокового желудочка и выступает в его просвет. В, Г– Опухоль

прорастает стенку бокового желудочка, не выступает в его просвет. Окраска гематоксилином и эозином

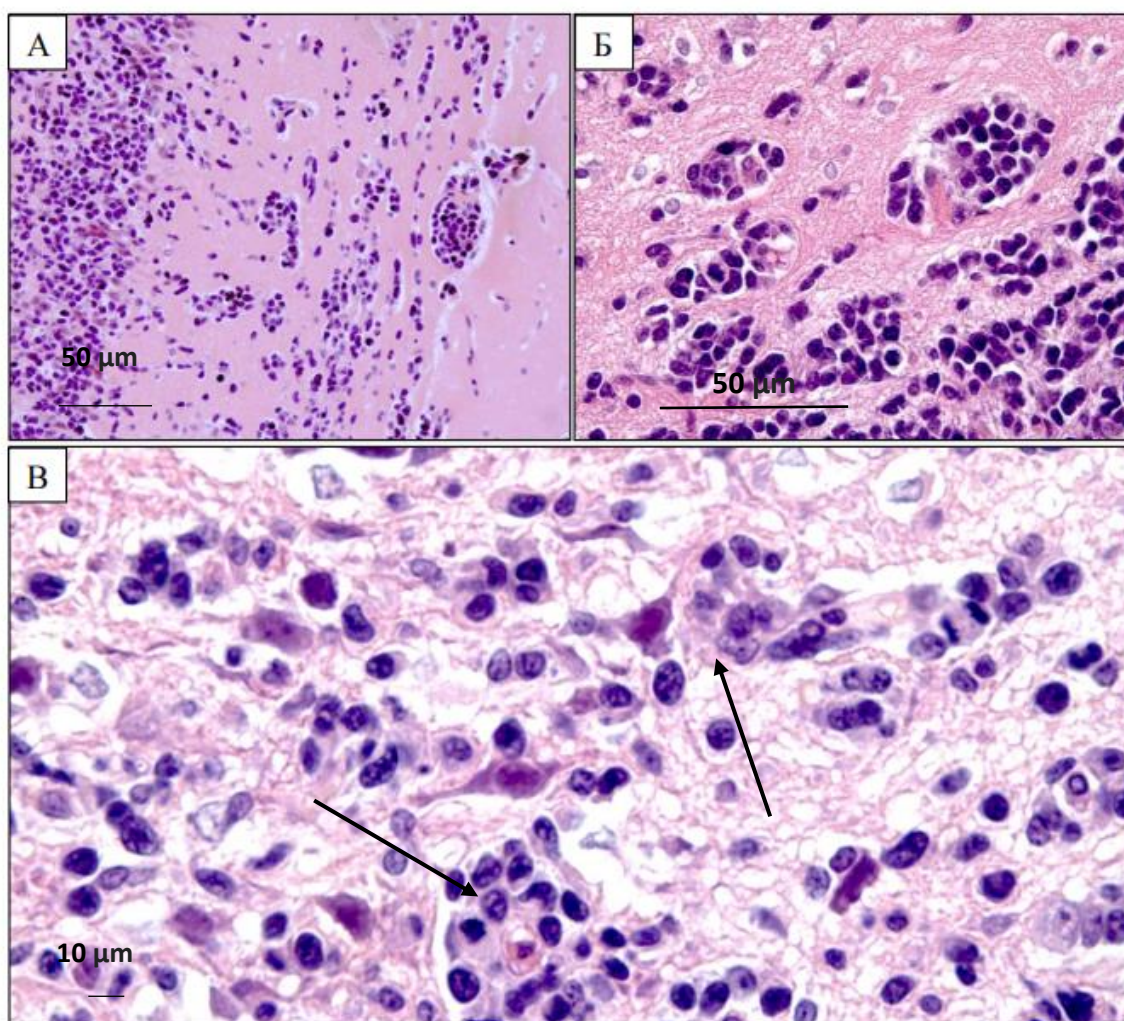


Рисунок 24. Морфологическая характеристика инфильтративного роста глиобластомы 101.8 (А, В – при введении Докс; Б – при введении Докс-PLGA). А, Б – Граница опухоли и тканей головного мозга. Инфильтративный рост опухоли. Скопления атипических клеток в пограничной зоне с образованием железистоподобных структур. В – Периваскулярное и перинейрональное скопление атипических клеток (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

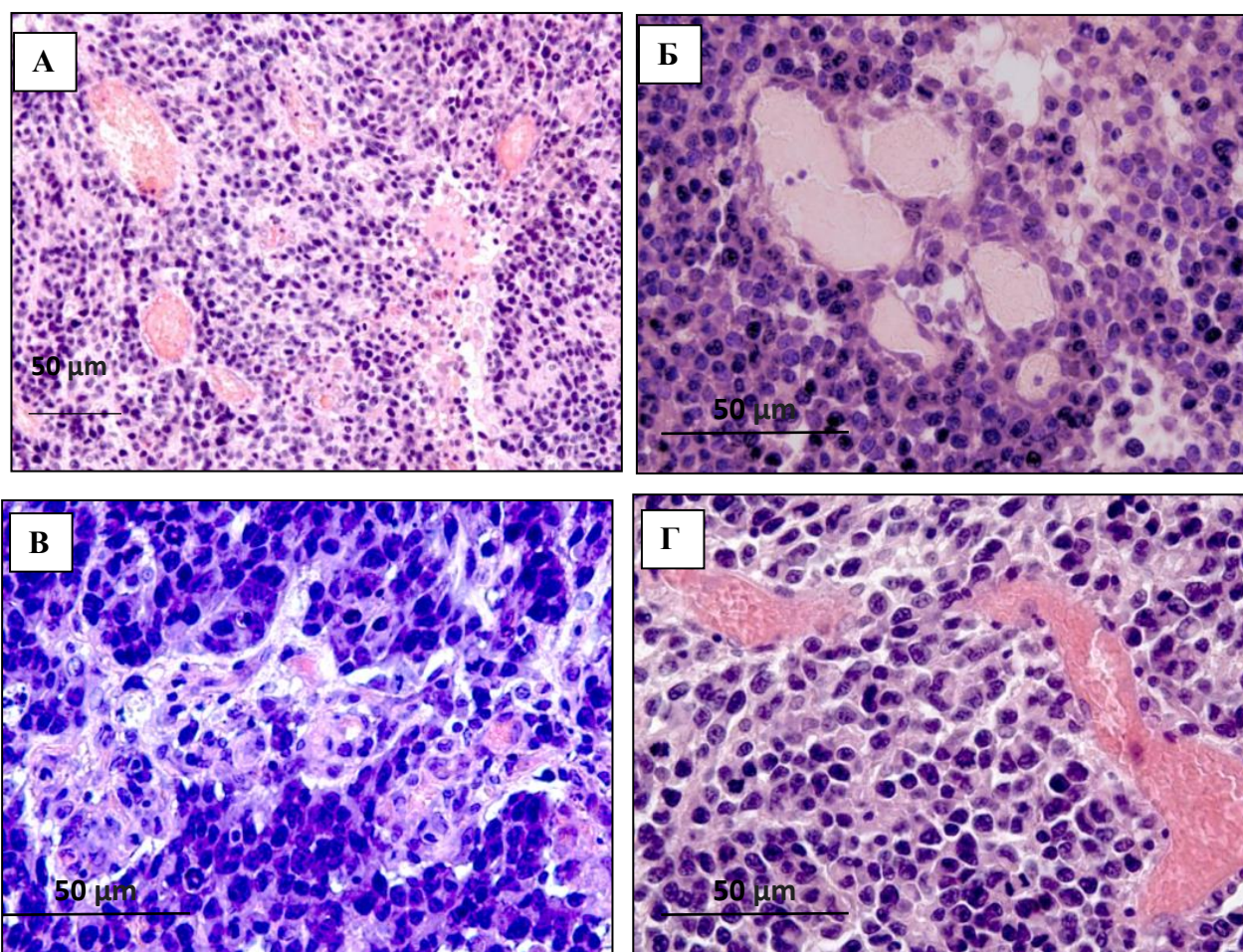


Рисунок 25. Морфологическая характеристика кровеносных сосудов в глиобластоме 101.8 (А, Б, Г – при введении Докс-PLGA; В – при введении Докс). Кровеносные сосуды с тонкими стенками и деформированным просветом (А, Г). Сосудистая розетка (Б) – скопления кровеносных сосудов овальной формы с тонкими стенками. Очаговая пролиферация эндотелия (В). Окраска гематоксилином и эозином

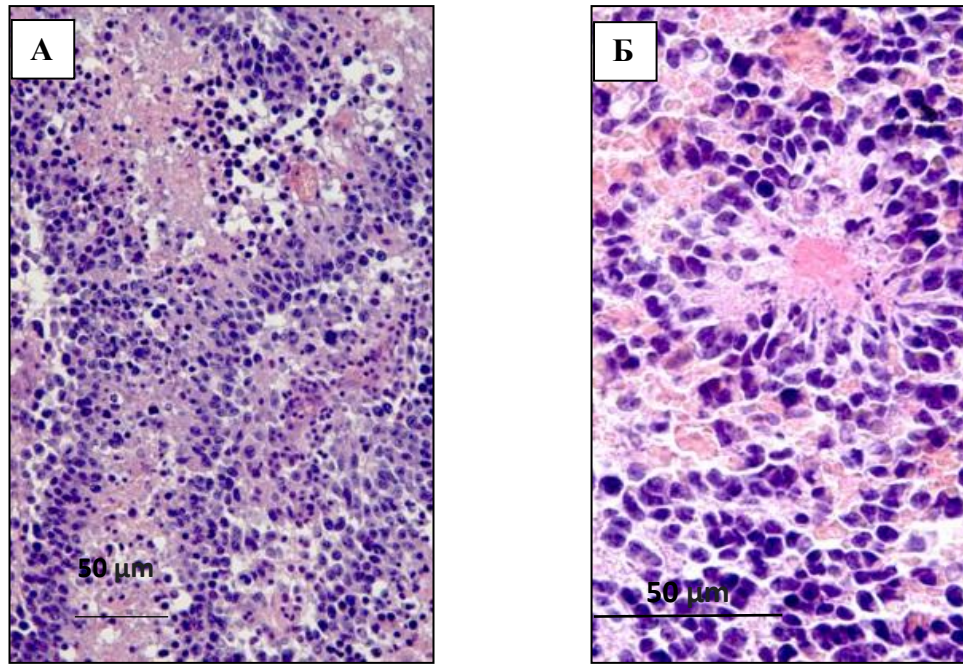


Рисунок 26. Некрозы в глиобластоме 101.8 (А, Б – при введении Докс-PLGA). А – обширные ландшафтообразные некрозы. Б – небольшой очаг некроза, вокруг которого образован палисадообразный вал из опухолевых клеток. Окраска гематоксилином и эозином

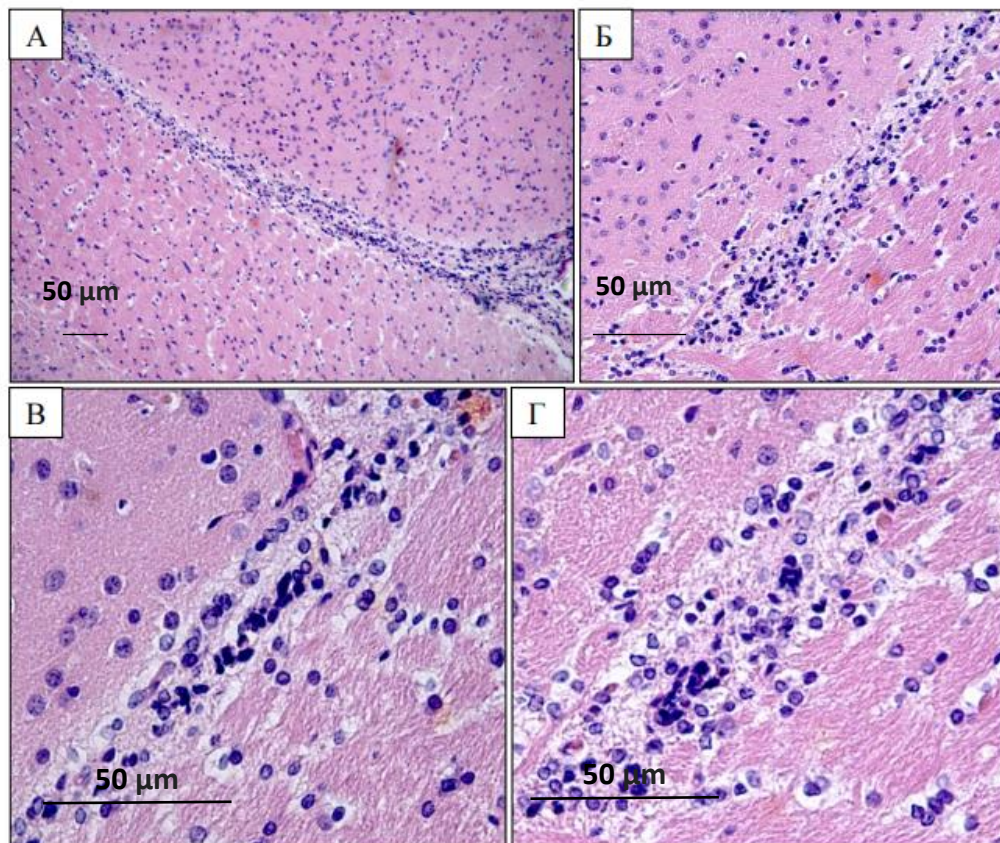


Рисунок 27. Глиальный рубец в головном мозге крыс, при введении терапевтических доз Докс-PLGA. В паравентрикулярной зоне линейный глиальный рубец (А), в котором выявляется скопление (Б, В) и единичные (Г) гиперхромные атипичные опухолевые клетки. Окраска гематоксилином и эозином

3.4.1 Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов

Проведена морфологическая оценка ГБ 101.8 у крыс без введения ЛП, данные представлены в таблице 8. У животных этой группы размеры опухоли колебались от 0,8 до 114,7 мм³, и они находились у всех животных в правом полушарии головного мозга в стенке бокового желудочка и прорастали ее, частично заполняя его просвет. Отмечался инфильтративный рост опухолей, в пограничной зоне опухолевые клетки были диффузно рассеяны и иногда образовывали скопления в виде железистоподобных структур вокруг нейронов. Опухолевые клетки полиморфные по форме и размерам с гиперхромными ядрами и узким, практически не различимым, ободком цитоплазмы. Многоядерные клетки «монстры» не выявлены. Число митотически делящихся клеток на стандартной площади среза составило 4-20, с признаками гибели 0-5. У 6 из 7 животных обнаружены небольшие очаги некрозов, иногда окруженные перпендикулярно расположенными вытянутыми по форме опухолевыми клетками – палисадообразные некрозы. У всех животных в опухоли было много сосудов с деформированным округлым и овальным широким просветом. Стенки большинства сосудов были тонкими и представлены эндотелием, окруженным тонким слоем волокон, количество сосудов варьировало от 0 до 13 в поле зрения. У 6-и из 7-и крыс сосуды выявляли «розетки» – скопления из 3-5 сосудов. В перитуморальной зоне головного мозга отмечался сетчатый отек, среди нейронов преобладали гиперхромные.

3.4.2 Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 у животных, которым вводили терапевтические дозы Докс

Суммарные данные по морфологической характеристике ГБ 101.8 у крыс, которым вводили Докс представлены в таблице 9.

При морфологическом исследовании ступенчатых и серийных срезов головного мозга животных этой группы опухоли были выявлены у 5 из 6 крыс. Размеры опухоли колебались от 0 до 34,9 мм³. У одного животного при детальном просмотре серийных ступенчатых срезов опухоль не определялась, в правом полушарии обнаружен очаг фиброза в мягкой мозговой оболочке, и в нем обнаружены сидерофаги. В прилежащей к этой зоне коре определялся небольшой очаг кальцификации. Обнаруженные у этого животного морфологические изменения в головном мозге, очевидно, развились в

результате введения троакара при трансплантации опухоли и свидетельствуют о правильном техническом выполнении процедуры, но опухоль не выявлена.

При морфологическом исследовании у 5 животных опухоли были локализованы в правом полушарии, паравентрикулярно, прорастали стенку бокового желудочка и частично выступали в его просвет. Отмечался инфильтративный рост опухоли, в ее пограничной зоне клетки были диффузно рассеяны и нередко образовывали скопления в виде железистоподобных структур вокруг нейронов. Опухоли были высококлеточными, состояли из полиморфных по форме и размерам клеток, с крупными гиперхромными ядрами.

Таблица 8. Морфологическая характеристика ГБ 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов

Параметры \ № крысы	1-16	1-17	1-18	1-19	1-20	1-21	1-24
Размер опухоли, мм ³	113,7	95,8	0,8	114,7	28,4	114,0	5,9
Локализация	Правое полушарие, вокруг бокового желудочка	Правое полушарие, вокруг бокового желудочка	Правое полушарие, вокруг бокового желудочка	Правое полушарие, вокруг бокового желудочка	Правое полушарие, вокруг бокового желудочка	Правое полушарие, вокруг бокового желудочка	Правое полушарие, вокруг бокового желудочка
Связь с боковым желудочком (Ув. 100)	Прорастает	Прорастает	Прорастает	Прорастает	Прорастает	Прорастает	Прорастает
Инфильтрирующий рост (Ув. 100)	+	+	+	+	+	+	+
Некрозы (Ув. 100)	+	+	+	-	+	+	+
Кровоизлияния (Ув. 100-200)	+	+	+	+	+	+	+
Клеточная атипия (Ув. 400)	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая
Митозы (Ув. 400-650, 5-10 п/з)	11-16	7-11	4-7	11-17	13-20	13-20	7-11
Гибнущие клетки (Ув. 400-650, 5-10 п/з)	1-5	0-1	0-1	1-5	2-5	1-4	1-2
Многоядерные клетки (Ув. 400)	-	-	-	-	-	-	-
Количество сосудов (Ув. 200, 5-10 в п/з)	0-13	3-8	3-5	3-10	2-11	0-6	0-10
Преобладание овальной или щелевидной формы сосудов (Ув. 200)	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной
Деформация просвета сосудов (Ув. 200)	Выражена	Выражена	Выражена	Выражена	Выражена	Выражена	Выражена
Стенка сосудов тонкая или частично сформированная (Ув. 400)	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Тонкая
Сосудистые розетки (Ув. 200)	+	+	+	+	-	+	+
Условные обозначения: * – не оценивали вследствие обширных кровоизлияний							

Таблица 9. Морфологическая характеристика ГБ 101.8 у крыс, которым вводили терапевтические дозы Докс

№ крысы	2-26	2-31	2-33	2-34	2-35	2-37
Параметры						
Размер опухоли, мм ³	29,4	9,2	34,9	12,9	12,9	0
Локализация	Правое полушарие паравентрикулярно	Правое полушарие паравентрикулярно	Правое полушарие паравентрикулярно	Правое полушарие паравентрикулярно	Правое полушарие паравентрикулярно	Опухоль не обнаружена, очаговый фиброз мягкой мозговой оболочки
Связь с боковым желудочком (Ув. 100)	Прорастает	Прорастает	Прорастает	Прорастает	Прорастает	
Инфильтрирующий рост (Ув. 100)	+	+	+	+	+	
Некрозы (Ув. 100)	-	-	+	-	-	
Кровоизлияния (Ув. 100-200)	+	+	+	+	+	
Клеточная атипия (Ув. 400)	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	
Митозы (Ув. 400-650, 5-10 п/з)	8-13	6-10	11-14	6-13	9-11	
Гибнущие клетки (Ув. 400-650, 5-10 п/з)	8-14	3-7	9-16	4-11	10-19	
Многоядерные клетки (Ув. 400)	-	+	-	+	-	
Количество сосудов (Ув. 200, 5-10 в п/з)	0-8	1-7	*Не оценивали	0-9	0-5	
Преобладание овальной или щелевидной формы сосудов (Ув. 200)	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной	Щелевидной	
Деформация просвета сосудов (Ув. 200)	Выражена	Выражена	Выражена	Выражена	Выражена	
Стенка сосудов тонкая или частично сформированная (Ув. 400)	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Тонкая	
Сосудистые розетки (Ув. 200)	-	+	-	-	-	

Условные обозначения: * – не оценивали вследствие обширных кровоизлияний

Таблица 10. Морфологическая характеристика ГБ 101.8 у крыс, которым вводили терапевтические дозы Докс-PLGA

№ крысы	3-35	3-36	3-48	3-51	3-53	3-54	3-424	3-425	3-426	3-427	3-428	
Параметры												
Размер опухоли, мм ³	0	0	3,7	1,9	0	1,9	11,7	24,3	2,1	1,4	0,5	
Локализация	Опухоль не обнаружена очаговый некроз мягкой мозговой оболочки, глиальный рубец, распространяющийся в паравентрикулярную зону		Правое полушарие, паравентрикулярно	Правое полушарие, паравентрикулярно	Правое полушарие, паравентрикулярно	Правое полушарие, паравентрикулярно	Правое полушарие, паравентрикулярно	Кора, паравентрикулярно	Кора, паравентрикулярно	Кора, паравентрикулярно	Кора, паравентрикулярно	
Связь с боковым желудочком (Ув. 100)			Прорастает	Прорастает, выступает в просвет	Не прорастает	Прорастает, выступает в просвет	Прорастает, выступает в просвет	Прорастает, выступает в просвет	Прорастает, выступает в просвет	Прорастает, выступает в просвет	Прорастает, выступает в просвет	Прорастает, выступает в просвет
Инфильтрирующий рост (Ув. 100)			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Некрозы (Ув. 100)			-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Кровоизлияния (Ув. 100-200)			+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Клеточная атипия (Ув. 400)			Высокая	Высокая	Относительно высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая
Митозы (Ув. 400-650, 5-10 п/з)			4-6	6-7	*Не оценивали	3-7	8-16	8-12	8-12	15-20	7-11	
Гибнущие клетки (Ув. 400-650, 5-10 п/з)			10-22	7-20	*Не оценивали	9-14	2-6	3-5	2-4	12-19	6-19	
Многоядерные клетки (Ув. 400)			-	0-3 в п/з при ув. 400	-	-	-	+	-	-	-	
Количество сосудов (Ув. 200, 5-10 в п/з)			4-9	1-6	*Не оценивали	2-7	0-5	0-7	0-2	*Не оценивали	0-2	
Преобладание овальной или щелевидной формы сосудов (Ув. 200)	1:1	Щелевидной	1:1	1:1	Щелевидной	1:1	Овальной	Щелевидной	Щелевидной			
Деформация просвета сосудов (Ув. 200)	Не выражена	Не выражена	Не выражена	Относительно выражена	Не выражена	Не выражена	Не выражена	Не выражена	Не выражена			
Стенка сосудов тонкая или частично сформированная (Ув. 400)	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Тонкая	Частично сформированная	Частично сформированная	Тонкая	Частично сформированная	Частично сформированная			
Сосудистые розетки (Ув. 200)	-	-	-	+	-	+	-	+	+			

У 2-х животных обнаружены единичные в гистологических срезах многоядерные клетки «монстры». Количество митозов на стандартной площади среза составило от 6 до 14, количество клеток с признаками гибели от 4 до 19, у одной крысы из данной группы в связи с большим числом клеток с признаками гибели при гистологическом исследовании ткань опухоли имела вид «звездного неба». У одной из крыс (2-33) в опухоли определялись небольшие некрозы и у всех мелкоочаговые кровоизлияния. Кровеносных сосудов было относительно немного, число их в поле зрения варьировало от 0 до 9. Они были с небольшой деформацией просвета, преимущественно щелевидной формы, с тонкой стенкой, образованной очагово-пролиферирующим эндотелием и небольшим слоем волокон. У 1 из 5 крыс сосуды образовывали розетки. В перитуморальной зоне обнаружены единичные опухолевые клетки и их скопления вокруг нейронов с признаками гибели в виде железистоподобных структур. Ткань головного мозга вокруг опухоли была в состоянии сетчатого, периваскулярного и перицеллюлярного отека, нейроны в этой зоне гиперхромные и с явлением хроматолиза.

3.4.3 Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 у животных, которым вводили терапевтические дозы Докс-PLGA

Суммарная морфологическая характеристика ГБ 101.8 у крыс, которым вводили Докс-PLGA представлена в таблице 10. У 2-х крыс в правом полушарии головного мозга при микроскопическом исследовании выявлены только очаговый фиброз мягкой мозговой оболочки и глиальный рубец, распространяющийся от коры головного мозга до паравентрикулярной области правого бокового желудочка. У одной крысы в глиальном рубце обнаружена небольшая опухоль. Объемы опухоли у животных этой группы варьировали от 0 до 24,3 мм³. У 9 крыс выявленные при микроскопическом исследовании опухоли локализовались в паравентрикулярной зоне правого полушария, а у 4-х из 9 также в коре головного мозга. Только у крысы 3-53 опухоль не нарушала эпендиму правого желудочка. У всех 9 животных отмечен инфильтративный рост опухоли, у 2-х крыс определялись небольшие очаги некроза, а у 8 из 9 – кровоизлияния. Все опухоли были высококлеточные, с выраженными признаками атипии. Количество митозов на стандартной площади среза составляло 4-20, а клеток с признаками гибели – 2-22. Многоядерные опухолевые клетки были выявлены у 2-х крыс (3-51 и 19-425). Количество сосудов варьировало от 0 до 9. У 4-х крыс преобладали сосуды с щелевидной формой и

частично сформированными стенками, у 4-х соотношение сосудов с щелевидной формой и овальным просветом было 1:1, а у крысы 19-426 преобладали сосуды округлой и овальной формы. Сосудистые розетки выявлены в 4-х опухолях.

3.4.4 Сравнительная морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

В группе животных, которым вводили Докс, по сравнению с животными без введения ЛП (табл. 11) размеры опухолей были меньше, реже выявляли некрозы, отмечалась более выраженная гибель клеток опухоли, у 2-х животных из каждой группы, которым вводили Докс и Докс-PLGA определялись гигантские опухолевые клетки, наличие которых расценивается как проявление терапевтического патоморфоза, относительно реже выявляли сосудистые розетки.

Сравнительная морфологическая характеристика ГБ 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Параметры	Без введения лекарственных препаратов	Докс	Докс-PLGA
Размер опухоли, мм ³	0.79-114.6	9.2-34.9	0-24.3
Локализация (Правое полушарие, паравентрикулярно)	7/7	5/5	9/9
Прорастает боковой желудочек (Ув. 100)	7/7	5/5	8/9
Инфильтрирующий рост (Ув. 100)	7/7	5/5	9/9
Некрозы (Ув. 100)	6/7	1/5	2/9
Кровоизлияния (Ув. 100-200)	7/7	5/5	8/9
Клеточная атипия (Ув. 400)	7/7	5/5	9/9
Митозы (Ув. 400-650, 5-10 п/з)	4-7 до 13-20	6-10 до 11-14	3-7 до 15-20
Гибнущие клетки (Ув. 400-650, 5-10 п/з)	0-1 до 2-5	3-7 до 10-19	2-4 до 10-22
Многоядерные клетки (Ув. 400)	0/7	2/5	2/9
Количество сосудов (Ув. 200, 5-10 в п/з)	0-6 до 0-13	0-5 до 1-7	0-2 до 4-9
Преобладание овальной или щелевидной формы сосудов (Ув. 200)	7/7	5/5	9/9
Деформация просвета сосудов (Ув. 200)	7/7	5/5	1/9
Стенка сосудов тонкая или частично сформированная (Ув. 400)	7/7	5/5	5/9
Сосудистые розетки (Ув. 200)	6/7	1/5	4/9

При морфологическом исследовании по сравнению с животными без введения ЛП, при введении Докс-PLGA животных, размеры опухоли были меньше, в них реже определялись некрозы, было больше клеток с признаками гибели, среди опухолевых клеток чаще определялись гигантские клетки.

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 введения ЛП появились крупные, многоядерные клетки - «терапевтические гиганты», увеличивалось число клеток с признаками гибели и уменьшалось число сосудистых розеток. Однако, на качественном уровне признаки лекарственного патоморфоза ГБ 101.8 у животных, при введении 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, содержание VEGF A в сыворотке крови животных и охарактеризованы GFAP-позитивные структуры опухоли.

3.5 Проллиферативная активность опухолевых клеток глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

В группах животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA лекарственный патоморфоз опухоли морфологически проявлялся изменением кинетики опухолевого роста - баланса пролиферативных процессов и гибели опухолевых клеток.

3.5.1 Оценка митотической активности опухолевых клеток глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином

Для оценки пролиферативной активности опухолевых клеток на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, проводили подсчет митозов на стандартной площади среза (рис. 20, табл. 12).

В обеих группах животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA, по сравнению с крысами без введения ЛП, количество митозов было меньше, но статистически значимых различий показателей не было (рис. 28, табл. 12).

Абс. число

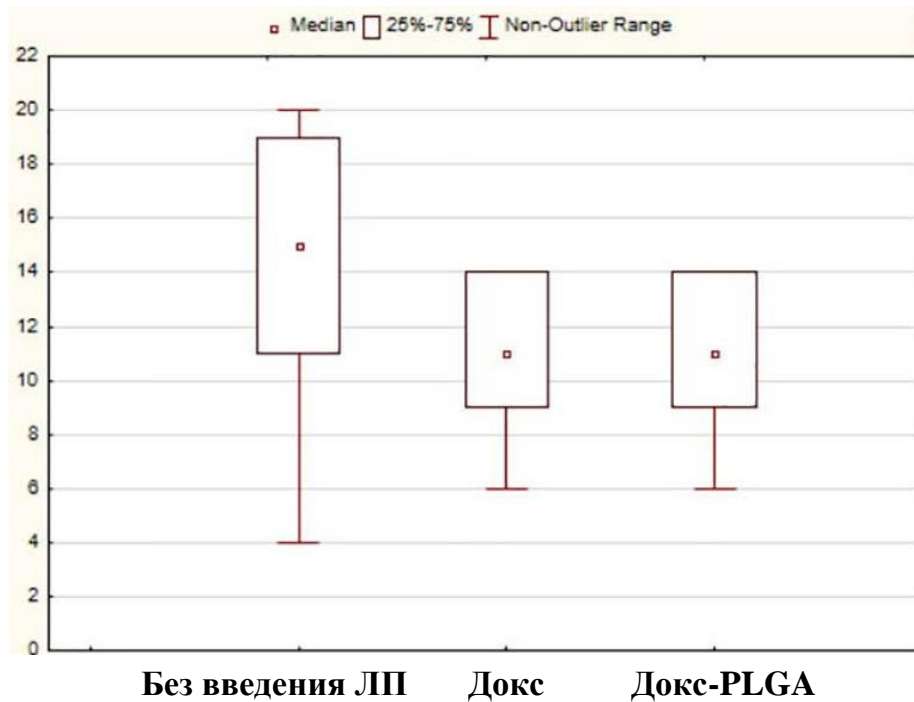


Рисунок 28. Число митозов на стандартной площади среза глиобластомы 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Описательная статистика Me (Q1; Q3)			
	Количество животных	Медиана	Квартили Q1; Q3
Без введения лекарственных препаратов	7	15,0	11,1; 19,2
Докс	9	11,0	9,0; 14,3
Докс-PLGA	8	10,0	6,0; 14,2
Kruskal-Wallis test: $H(2, N=15) = 7,736445$ $p = ,209$			
	Без введения лекарственных препаратов	Докс	Докс-PLGA
Без введения лекарственных препаратов		0,4	0,3
Докс			1,0
Докс-PLGA			

3.5.2 Оценка содержания Ki67-позитивных опухолевых клеток в глиобластоме 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Для сравнительной оценки пролиферативной активности опухолевых клеток в экспериментальной 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. 29). Проводили подсчет иммунопозитивных клеток в стандартном поле зрения и соотносили их число с общим количеством опухолевых клеток, вычисляя процентную долю позитивных клеток (рис. 30, табл. 12).

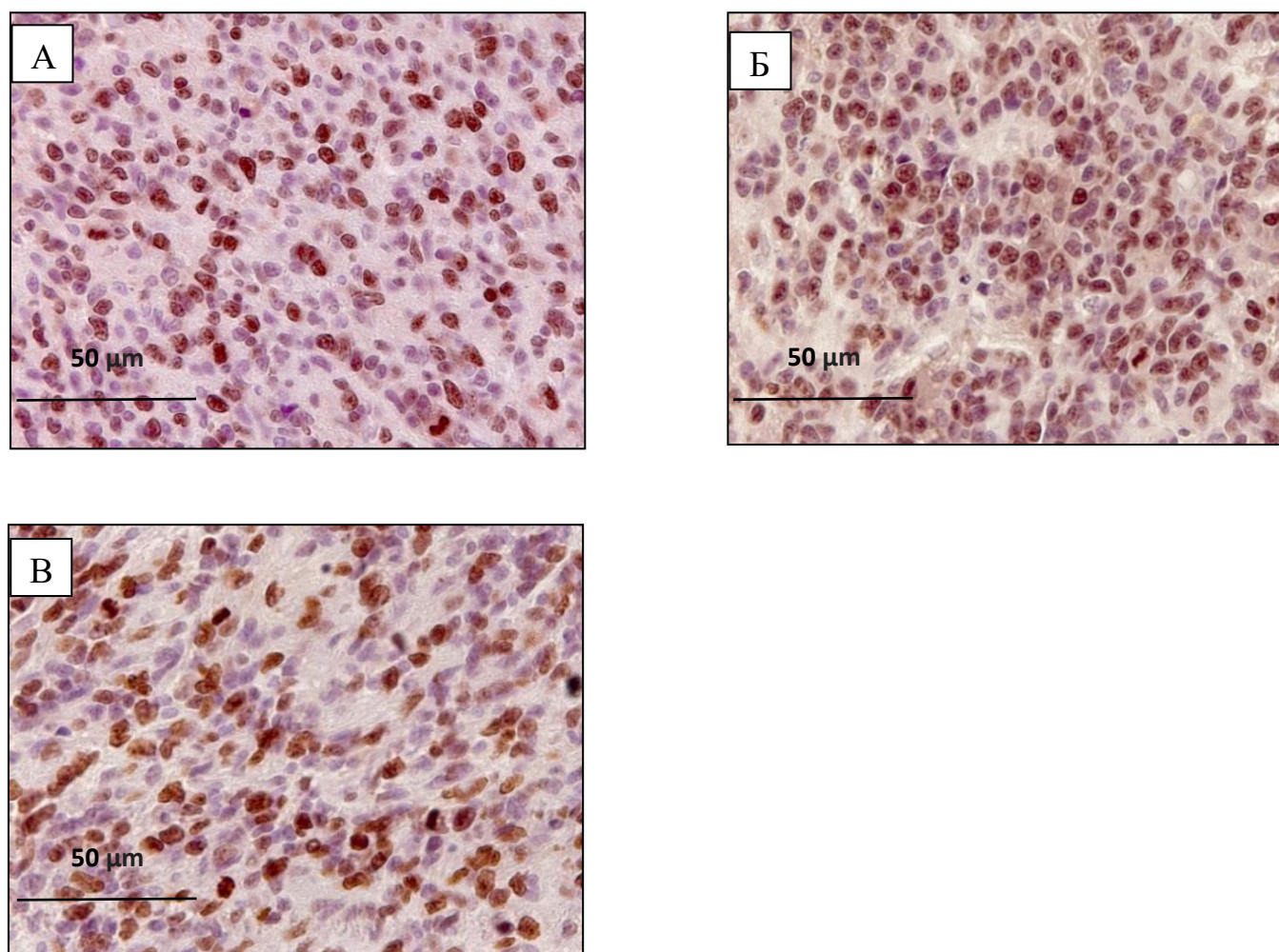


Рисунок 29. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki67. Иммунопозитивная реакция в ядрах клеток глиобластомы 101.8. А – без введения лекарственных препаратов; Б – при введении Докс; В – при введении Докс-PLGA. Окраска гематоксилином

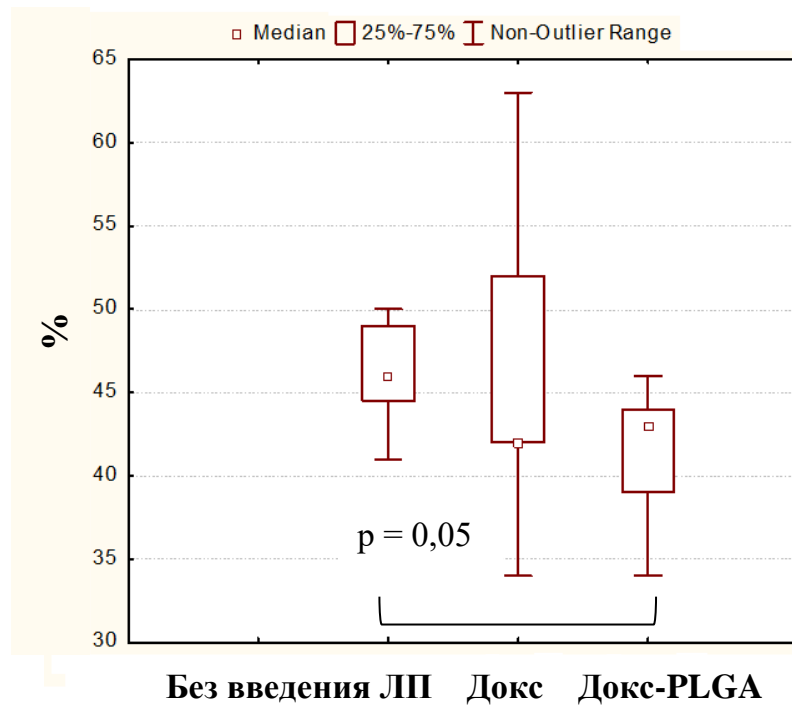


Рисунок 30. Содержание Ki67-позитивных клеток в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA

Описательная статистика Me (Q1; Q3)			
	Количество животных	Медиана	Квартили Q1; Q3
Без введения лекарственных препаратов	7	46,0	44,0; 49,0
Докс	9	42,5	42,5; 52,0
Докс-PLGA	8	43,5	39,0; 44,0
Kruskal-Wallis test: $H(2, N=15) = 7,736445$ $p = ,209$			
	Без введения лекарственных препаратов	Докс	Докс-PLGA
Без введения лекарственных препаратов		0,17	0,05
Докс			1,00
Докс-PLGA			

По данным оценки содержания Ki67-позитивных клеток в ГБ 101.8 у крыс статистически значимые отличия были выявлены только между группами животных, которым вводили Докс-PLGA и без введения ЛП.

Таким образом, при введении крысам с ГБ 101.8 Докс-PLGA статистически значимо снижается пролиферативная активность клеток опухоли, определяемая по содержанию Ki67-положительных клеток, что отражает снижение пролиферативной активности.

Медианы (0,25; 0,75) количества митозов, Ki67-позитивных, гибнущих клеток и коэффициента клеточного обновления (ККО) в ГБ 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Группы наблюдения	Фигуры митозов, абс. число на стандартной площади среза 65 025 мкм ² , x 400	Относительное количество Ki67-позитивных клеток, % (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
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)
2.Введение 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.Введение 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)
Статистически значимые различия между исследованными группами		p ₍₁₋₃₎ = 0,05	p ₍₁₋₂₎ = 0,03	p ₍₁₋₂₎ = 0,002 p ₍₁₋₃₎ = 0,04

3.6 Сравнительная оценка клеток с морфологическими признаками гибели в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Ключевым фактором в реакции клеток опухоли на химиотерапию является активация апоптотического пути. С целью оценки активации гибели клеток опухоли подсчитывали число клеток с признаками гибели в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином в ГБ 101.8, у животных без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA.

3.6.1 Гибнущие опухолевые клетки в гистологических препаратах глиобластомы 101.8, у животных исследуемых групп

У животных, которым вводили Докс число клеток с признаками гибели в ГБ 101.8 на стандартной площади среза, окрашенного гематоксилином и эозином, было выше, чем у животных без введения ЛП (рис. 21, 32, 31, табл. 12).

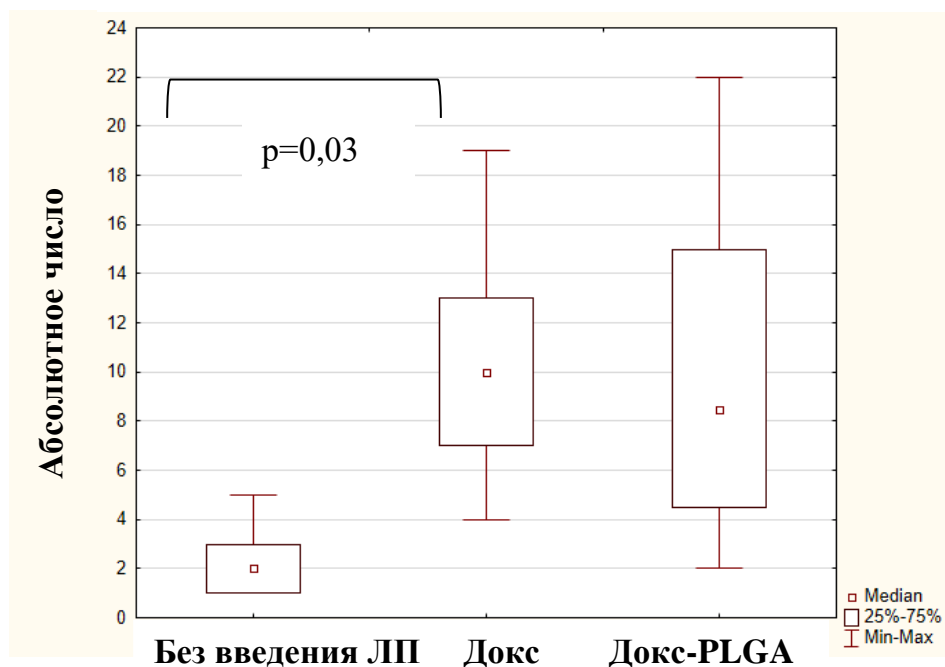


Рисунок 31. Число клеток с признаками гибели на стандартной площади среза глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Описательная статистика Me (Q1; Q3)			
	Количество животных	Медиана	Квартили Q1; Q3
Без введения лекарственных препаратов	7	2,0	1,1; 2,5
Докс	9	10,0	7,0; 13,5
Докс-PLGA	8	8,0	4,2; 14,5
Kruskal-Wallis test: $H(N=15) = 7,736445$ $p = ,0209$			
	Без введения лекарственных препаратов	Докс	Докс-PLGA
Без введения лекарственных препаратов		0,03	0,09
Докс			1,00
Докс-PLGA			

3.6.2 Коэффициент клеточного обновления в глиобластоме 101.8 у животных исследуемых групп

Для оценки кинетики опухолевого роста (Лушников Е.Ф. с соавт., 2001) в тканях ГБ 101.8 у крыс экспериментальных групп, рассчитывали коэффициент клеточного обновления (ККО) – отношение количества фигур митозов к количеству клеток с морфологическими признаками гибели на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. По сравнению с животными без введения лекарственных препаратов ККО в ГБ 101.8 статистически был значимо ниже как при введении Докс ($p=0,002$), так и Докс-PLGA ($p=0,04$). Коэффициент клеточного обновления в ГБ 101.8 не различался у животных при введении Докс-PLGA и Докс (табл.12, рис. 32).

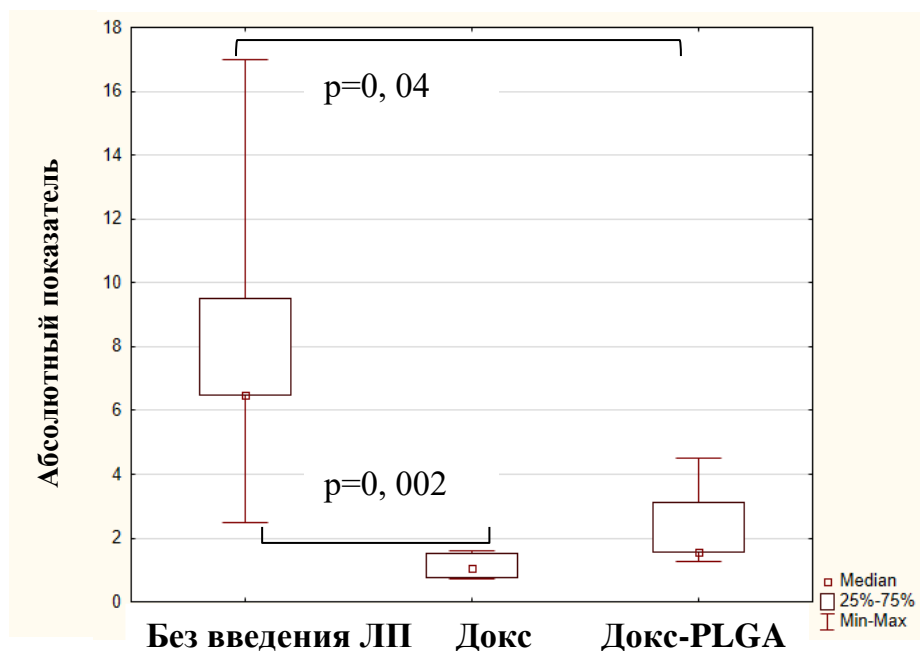


Рисунок 32. Коэффициент клеточного обновления в глиобластоме 101.8 у животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Описательная статистика Me (Q1; Q3)			
	Количество животных	Медиана	Квартили Q1; Q3
Без введения лекарственных препаратов	7	6,5	4,2; 13,1
Докс	9	1,0	0,9; 1,4
Докс-PLGA	8	1,5	0,5; 4,4

Kruskal-Wallis test: $H(N=21) = 12,08905$ $p = 0,0024$			
	Без введения лекарственных препаратов	Докс	Докс-PLGA
Без введения лекарственных препаратов		0,002	0,042
Докс			1,000
Докс-PLGA			

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

3.7 Характеристика кровеносных сосудов глиобластомы 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

С целью оценки морфологических данных по эффективности проводимой терапии крыс при экспериментальной ГБ 101.8, проводили оценку количества кровеносных сосудов в опухоли морфометрическим методом в гистологических препаратах, окрашенных изолектином В4. В сыворотке крови животных исследуемых групп иммуноферментным методом определяли количественное содержание васкуло-эндотелиального фактора роста А (VEGF А).

3.7.1 Гистохимическое исследование ангиогенеза в глиобластоме 101.8 крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Для сравнительного исследования ангиогенеза в ГБ 101.8 крыс без введения ЛП и при лекарственном патоморфозе при введении Докс и Докс-PLGA оценивали степень васкуляризации опухоли методом подсчета числа сосудов на стандартной площади среза. Сосуды выявляли путем гистохимического окрашивания изолектином В4 (рис. 33).

Согласно результатам исследования у животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA количество сосудов снижалось относительно группы животных без введения ЛП, но достоверные различия выявлены только в группе животных, которым вводили Докс (рис. 34).

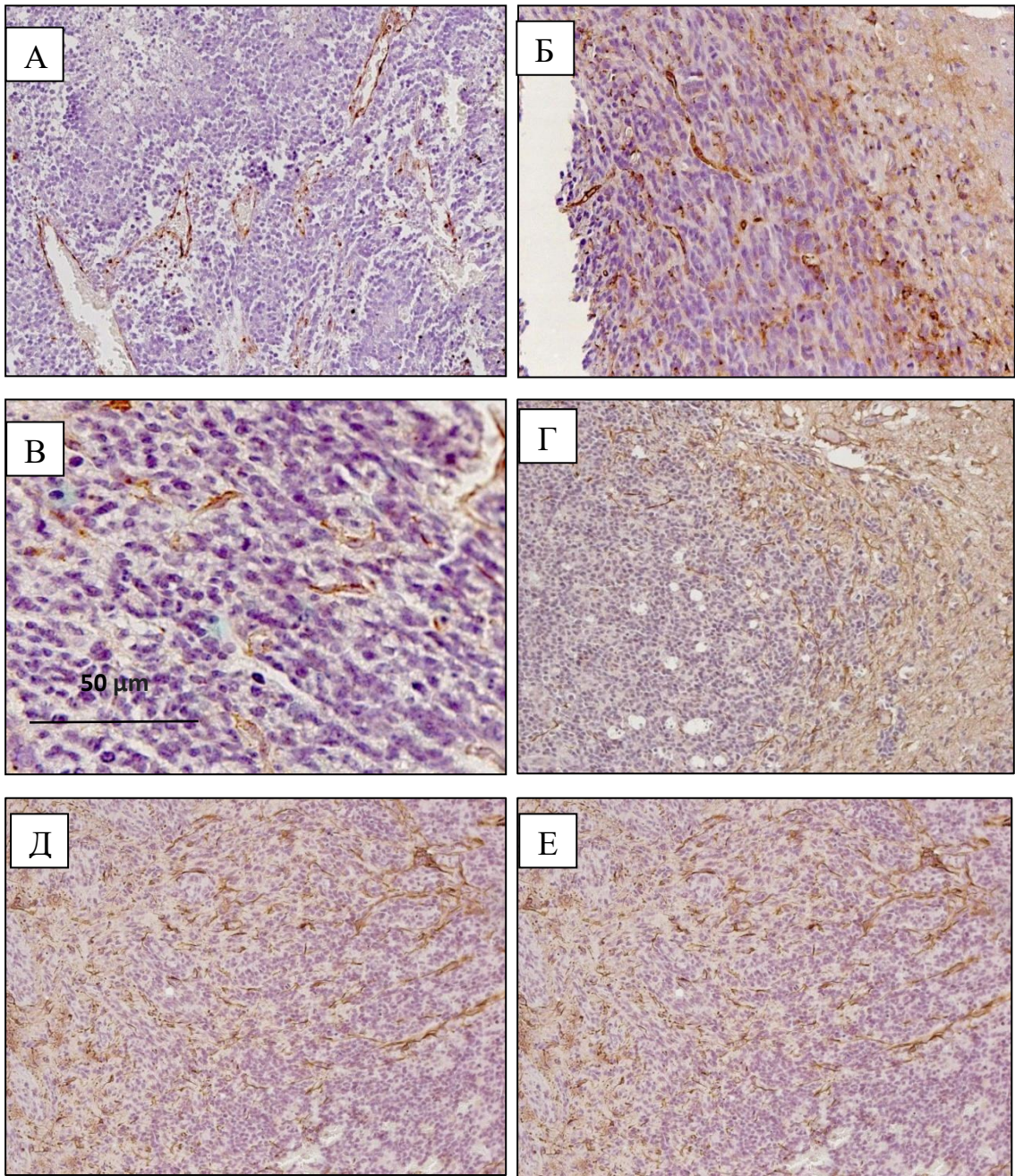


Рисунок 33. Гистохимическая реакция с изолектином В4 – маркером эндотелиальных клеток (А-В). Иммуногистохимическая реакция с антителами к GFAP – маркеру нейроглии (Г-Е). А – без введения лекарственных препаратов, сосуды с широкими деформированными просветами и тонкими стенками. Б, В – сосуды с частично сформированными стенками и щелевидным просветом. Б – при введении Докс; В – при введении Докс-PLGA. Г – без введения лекарственных препаратов, GFAP-позитивные структуры в периферической зоне опухоли. Д – при введении Докс; Е – при введении Докс-PLGA – в периферических и центральных отделах опухоли х: А, Г-Е–100; Б–200, В–400 Окраска гематоксилином

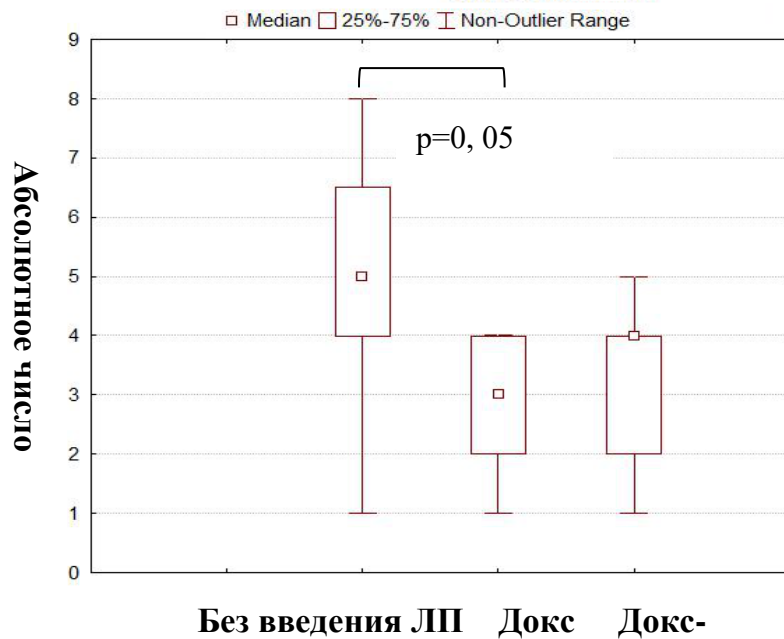


Рисунок 34. Количество сосудов на стандартной площади среза в ГБ 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA

Описательная статистика Me (Q1; Q3)			
	Количество животных	Медиана	Квартили Q1; Q3
Без введения лекарственных препаратов	7	5,0	4,0; 6,5
Докс	9	3,5	2,0; 4,0
Докс-PLGA	8	4,0	2,0; 4,0

Kruskal-Wallis test: $H(N=35)=8,279358$ $p=0,0159$			
	Без введения лекарственных препаратов	Докс	Докс-PLGA
Без введения лекарственных препаратов		0,05	0,13
Докс			1,00
Докс-PLGA			

Таким образом, количество сосудов в ГБ 101.8 было меньше в группе животных, которым вводили Докс.

3.7.2 Иммуноферментный анализ содержания белка VEGF A в сыворотке крови у животных с глиобластомой 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

Васкуляризация опухоли регулируется многими факторами, в том числе секретируемыми клетками опухоли. Одним из первых эндотелиальных факторов роста сосудов был открыт VEGF A, также известный как фактор проницаемости сосудов.

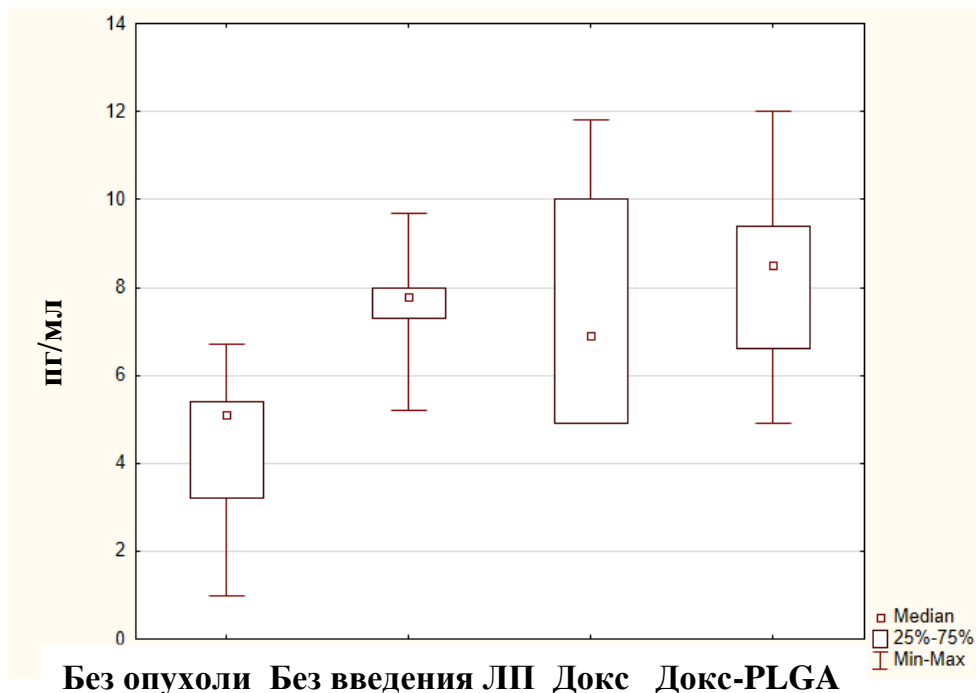


Рисунок 35. Количество белка VEGF A в сыворотке крови животных без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

При иммуноферментном анализе количества белка VEGF A в сыворотке крови между животными исследуемых групп и животными без опухоли, статистически значимых различий показателей не обнаружено (рис. 35).

Таким образом, при введении крысам Докс по сравнению с животными без введения ЛП и при введении Докс-PLGA уменьшалось количество кровеносных сосудов в опухоли. У животных, при введении Докс и Докс-PLGA, в ГБ 101.8 было достоверно снижено количество сосудов по сравнению с животными без введения ЛП, при оценке срезов опухоли окрашенных изолектином B4.

3.8 Характеристика GFAP-позитивных структур в глиобластоме 101.8 у крыс без введения лекарственных препаратов и при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

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 (рис. 33 Г-Е).

Таким образом, при введении терапевтических доз Докс и его PLGA-наноформы при экспериментальной ГБ 101.8 увеличивалась продолжительность жизни животных, объемы опухолей были меньше за счет торможения их роста. По данным морфологической оценки ГБ 101.8 при введении крысам Докс и Докс-PLGA коэффициент клеточного обновления и количество сосудов были ниже, чем у животных без введения ЛП. По сравнению с Докс, противоопухолевое действие Докс-PLGA на ГБ 101.8 крыс более выражено на основании снижения пролиферативной активности, по данным оценки содержания Ki67-положительных клеток опухоли, увеличению средней продолжительности жизни, выживаемости животных, меньшим объемами опухоли и торможению ее роста.

3.9 Морфологические и биохимическое исследование кардиотоксического и гепатотоксического действия терапевтических доз Докс и Докс-PLGA у крыс с глиобластомой 101.8

3.19.1 Морфологическое и биохимическое исследование кардиотоксичности у крыс с глиобластомой 101.8 исследуемых групп

Патологических изменений в тканях сердца у крыс с опухолью без введения ЛП не было выявлено. Кардиомиоциты имели четко выраженную поперечную исчерченность, ядра овальные нормохромные. Определялись единичные гистиоциты и лимфоциты в межмышечной рыхлой соединительной ткани. Наблюдался неравномерное полнокровие сосудов гемомикроциркуляторного русла (рис. 36 А).

При введении животным Докс в миокарде выявлены очаги некроза (единичные в поле зрения при увеличении 400), воспалительная инфильтрация гистиоцитами и лимфоцитами (рис. 36 В). Обширные зоны межзачаточного отека были со слабо выраженной воспалительной инфильтрацией лимфоцитами и гистиоцитами, что соответствует токсическому миокардиту.

При введении животным Докс-PLGA патоморфологические изменения в миокарде были менее выражены, чем в группе крыс, которым вводили Докс. Количество очагов некроза и их распространенность (рис. 36 Г), межзачаточный отек и диффузная инфильтрация гистиоцитами и лимфоцитами были менее выражены (рис. 36 Д).

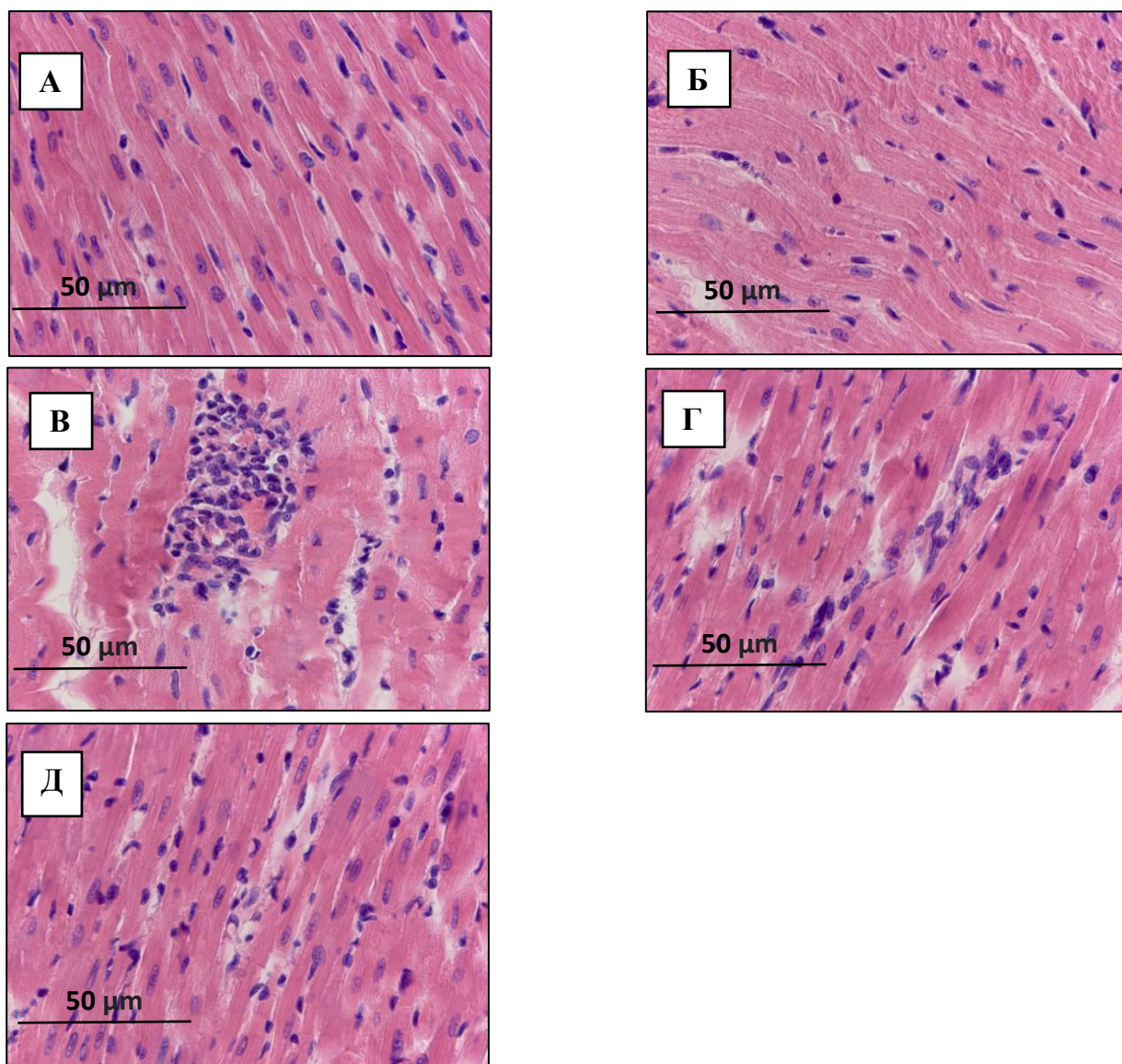


Рисунок 36. Морфологическая характеристика миокарда крыс с глиобластомой 101.8 (А), которым вводили терапевтические дозы Докс (Б, В) и Докс-PLGA (Г, Д): А – Кардиомиоциты с четко выраженной поперечной исчерченностью, ядра овальной формы волокна межмышечной соединительной ткани тонкие; Б – Волнообразная деформация, контрактурные повреждения; В – Очаг некроза кардиомиоцитов с воспалительной инфильтрацией. Межуточный отек; Г – Контрактурные повреждения кардиомиоцитов, с исчезновением поперечной исчерченности; Д – Выражен межуточный отек и слабо выражена диффузная воспалительная инфильтрация гистиоцитами и лимфоцитами. Окраска гематоксилином и эозином

У животных с ГБ 101.8 без введения ЛП, активность КФК в сыворотке крови была повышена, по сравнению с референсными значениями популяции интактных крыс. Повышение активности КФК свидетельствует о повреждении метаболически активных тканей и клеток, которые активно потребляют АТФ, таких как клетки головного мозга, опухолевые клетки, кардиомициты. У животных с ГБ 101.8, которым вводили Докс-PLGA повышение активности КФК как общей, так и сердечной ее изоформы было статистически значимо меньше, чем в группе крыс, которым вводили Докс и у животных с опухолью без введения ЛП (рис. 37, табл. 13).

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, может быть связано с биологией опухоли интенсивным процессом ее роста и распада, 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, которым вводили Докс и Докс-PLGA, однако при введении 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, при введении Докс-PLGA (рис. 38, табл. 13).

Таблица 13

Активности ферментов в сыворотке крови крыс Вистар с ГБ 101.8 при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA. Ме (0,25; 0,75)

Показатель \ Группы наблюдения	1. Без введения лекарственных препаратов, n=7	2. Введение Докс, n=9	3. Введение Докс-PLGA n=8	Статистическая значимость различий
КФК Ед/л Креатинфосфокиназа, референсные значения (431-686) *	5200 (4096;6179)	4811 (4286;5682)	2115 (1920;2444)	p ₂₋₃ = 0,0001; p ₁₋₃ = 0,00003
КФК-МВ Ед/л Креатинфосфокиназа сердечная фракция, референсные значения (0-120) *	2743 (1667;2870)	1620 (1423;1816)	858 (719;1169)	p ₁₋₂ = 0,01; p ₂₋₃ = 0,0004; p ₁₋₃ = 0,0009
АЛТ Ед/л Аланинаминотрансфераза, референсные значения (63-95) *	57 (46;71)	70 (65;71)	62 (57;71)	p ₁₋₂ = 0,041
АСТ Ед/л Аспартатаминотрансфераза, референсные значения (132-161) *	247 (196;273)	225 (219;231)	182,5 (166;198)	p ₂₋₃ = 0,002; p ₁₋₃ = 0,004
Коэффициент Ригиса , де референсные значения (0,91-0,75) *	4,33 (4,26-3,84)	3,21 (3,36-3,25)	2,93 (2,91-2,78)	p ₁₋₃ = 0,004

*Ананич И.В. Биохимические характеристики крови крыс. Ветеринарная клиника. 2008, № 10, с. 18-19

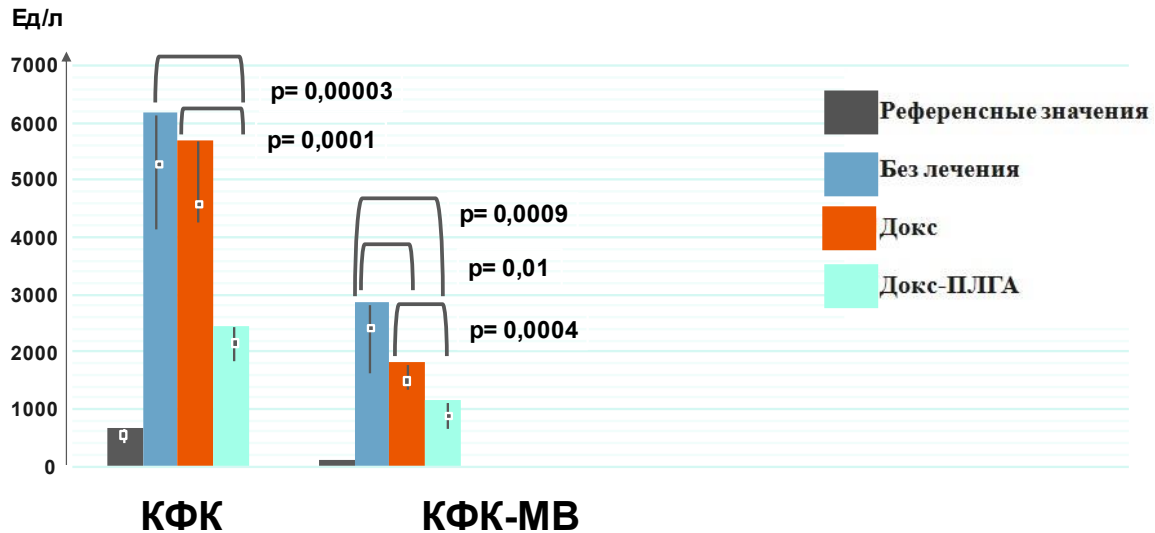


Рисунок 37. Биохимическое исследование активности КФК и КФК-МВ в сыворотке крови интактных крыс, с ГБ 101.8 без введения лекарственных препаратов и при введении Докс и Докс-PLGA (Me 25%-75%)

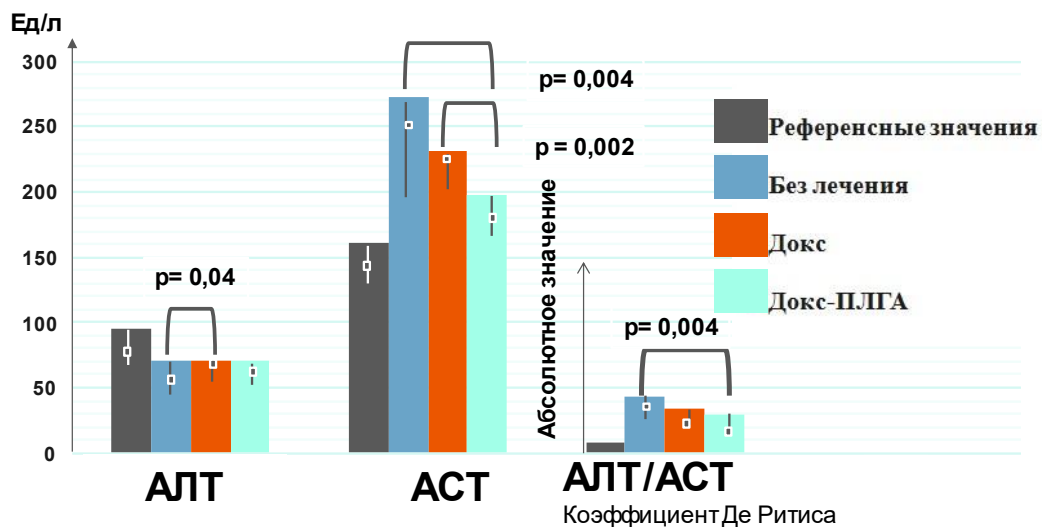


Рисунок 38. Биохимическое исследование активности АЛТ, АСТ в сыворотке крови и коэффициент де Ритиса у интактных животных, с ГБ 101.8 без введения лекарственных препаратов, и при введении Докс и Докс-PLGA (Me 25%-75%)

Таким образом, по данным морфологического и биохимического исследования по сравнению с Докс терапевтические дозы Докс-PLGA оказывает менее выраженное кардиотоксическое действие.

3.9.2 Морфологическое и биохимическое исследование гепатотоксичности у крыс с глиобластомой 101.8 при введении Докс и Докс-PLGA

У крыс с ГБ 101.8 патоморфологических изменений не выявлено. Дольковое и балочное строение печени было сохранно, гепатоциты с базофильной зернистостью цитоплазмы (рис. 39 А). Количество неэпителиальных клеточных элементов – клеток Купфера и лимфоцитов внутри долек было небольшим.

У крыс, которым вводили Докс и Докс-PLGA, балочное и дольковое строение печени сохранялось, гепатоциты периферических отделов долек были в состоянии умеренной мелко- и среднекапельной вакуольной дистрофии, более распространенной в периферических отделах долек. Количество неэпителиальных клеток было увеличено (рис. 39 Б-В).

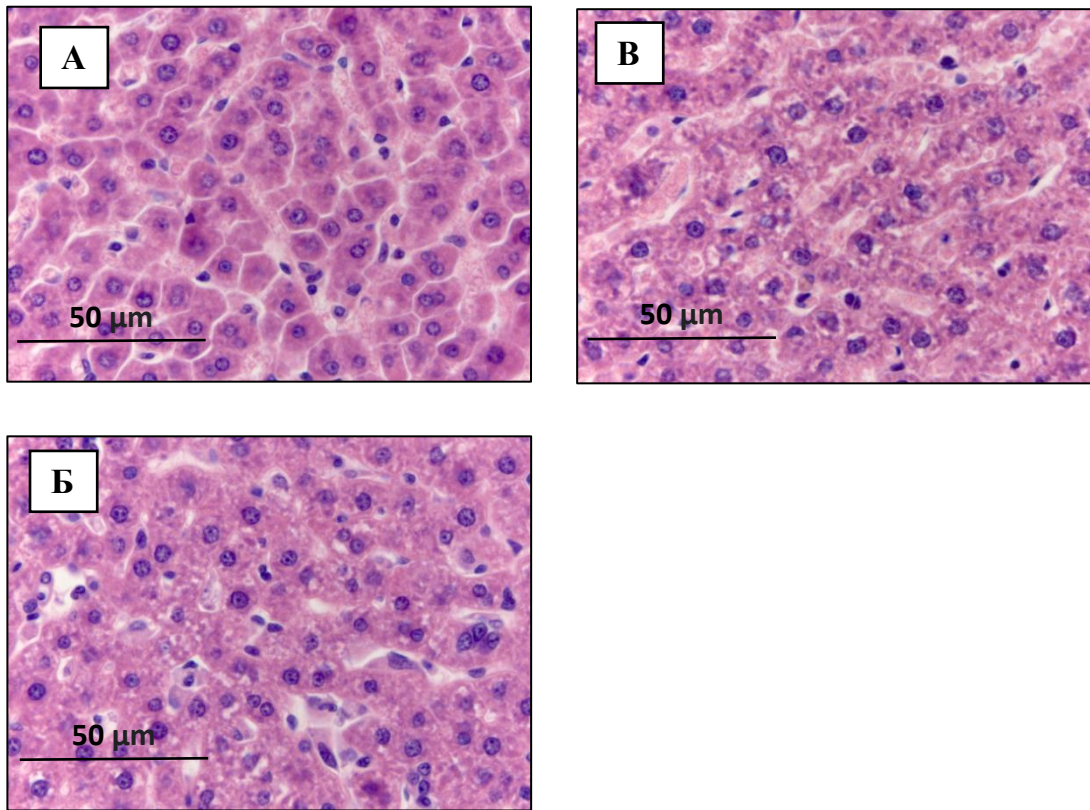


Рисунок 39. Морфологическая характеристика печени (А-В) крыс с глиобластомой 101.8 (А), при введении терапевтических доз Докс (Б) и Докс-PLGA (В): А – Гепатоциты с базофильной зернистостью цитоплазмы; Б – Умеренная мелко и среднекапельная вакуолярная дистрофия гепатоцитов; В – Слабо выраженная мелкокапельная вакуолярная дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином

Сравнительная оценка активности ферментов, в большей степени отражающая повреждение клеток печени (Amacher D.E., 1998; Shivakumar P. et al., 2012), показала статистически значимое увеличение АЛТ в сыворотке крови крыс с ГБ 101.8, после лечения Докс, но ее активность 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 (табл. 13).

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.

3.10 Морфологические изменения почек у крыс при введении терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

3.10.1 Морфологическое исследование почек у интактных животных

Патологические изменения в почках у интактных животных не были выявлены (рис. 40 и 41 А-В, рис. 42 А), почечные клубочки были с неравномерным полнокровием капиллярных петель, просветы капсулы Шумлянско-Боумена узкие, свободные от содержимого, эпителий наружного листка плоский, просветы проксимальных и прямых извитых канальцев узкие, а в части из них они не определяются. Щеточная каемка ярко эозинофильная, с выраженной равномерной ШИК-положительной реакцией. Петли Генле были со свободными просветами, выстланы кубическим эпителием. Дистальные извитые и прямые канальцы со свободными просветами, эпителий кубический с четкими контурами ядра и цитоплазмы. Собирательные трубочки с широкими просветами без содержимого, выстланы плоским эпителием. У всех животных контрольной группы просветы лоханки свободные, выстланы плоским эпителием, в собственной пластинке слизистой оболочки выявлены единичные лимфоциты. В строме коркового вещества почки у 3-х крыс были небольшие скопления лимфоцитов и гистиоцитов. Строма мозгового вещества рыхлая, представлена продольно ориентированными пучками тонких коллагеновых волокон. При ультраструктурном исследовании эпителиоциты проксимальных и дистальных канальцев и собирательных трубочек имели нормальное строение.

3.10.2 Морфологическое исследование почек у животных на 8-е сутки после введения терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

На 8-е сутки после введения животным Докс (рис. 40 и 41 Г-Е, 42 Б) и Докс-PLGA (рис. 40 и 41 К-М, рис. 42 Г), почечные клубочки были с тонкими неравномерно полнокровными капиллярными петлями. Просветы многих проксимальных извитых и прямых канальцев были расширены, в них выявлены единичные десквамированные эпителиальные клетки и небольшие отложения зернистых масс, отмечали снижение интенсивности окрашивания гликопротеинов щеточной каемки при ШИК-реакции и ее

разрушение (рис. 43). Просветы дистальных извитых и прямых канальцев были расширены, во многих из них на светооптическом уровне выявлено зернистое содержимое и десквамированный эпителий, люминальная поверхность эпителиоцитов с нечеткими границами. 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

3.10.3 Морфологическое исследование почек у животных на 21-е сутки после введения терапевтических доз Докс и Докс-PLGA

При морфологическом исследовании почек у животных на 21-е сутки после введения Докс (рис. 40 и 41 Ж-И, рис. 42 В) и Докс-PLGA (рис. 40 и 41 Н-П, рис. 42 Д) капиллярные петли клубочков почек и интрагломерулярное пространство неравномерно расширены. В отдельных клубочках интрагломерулярные пространства заполнены гомогенными эозинофильными массами. Проксимальные извитые и прямые канальцы с расширенными просветами, разрушенной щеточной каемкой (рис. 43). В проксимальных и дистальных прямых и извитых канальцах и петлях Генле выявлены эозинофильные массы и десквамированный эпителий. Границы люминальной поверхности эпителиоцитов дистальных канальцев нечеткие. Во многих собирательных трубочках обнаружены цилиндры. Отмечалась диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация коркового вещества и отек стромы мозгового. Описанные выше патоморфологические изменения были менее выраженными у животных, которым вводили Докс-ПГЛА. При просвечивающей электронной микроскопии в проксимальных канальцах обнаружены структуры щеточной каемки, крупные вакуоли в цитоплазме и некроз эпителиальных клеток дистальных канальцев и собирательных трубочек. Просветы дистальных канальцев и собирательных трубочек были заполнены волокнистыми структурами и фрагментами гибнущих клеток.

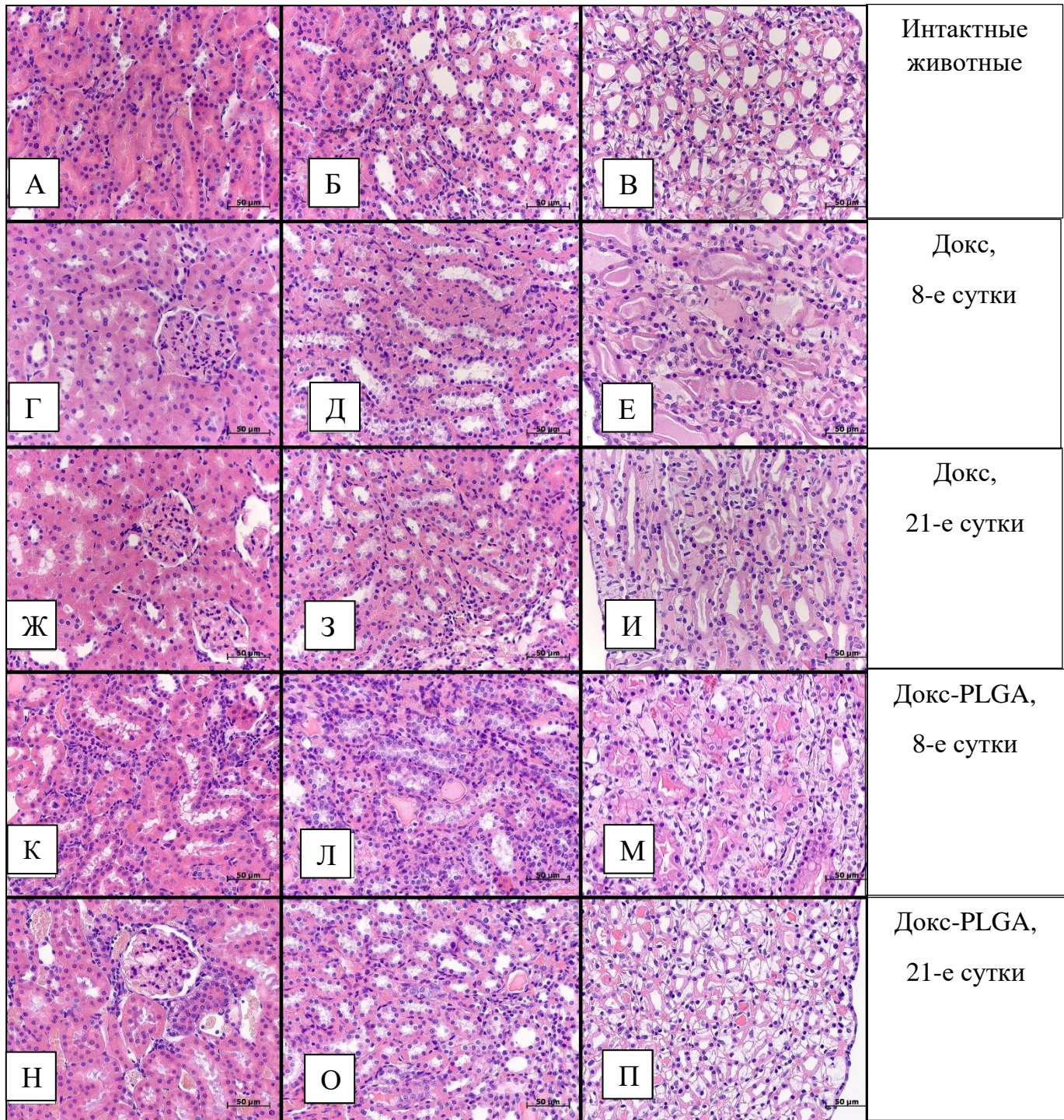


Рисунок 40. Проксимальные (левая колонка), дистальные канальцы нефрона (средняя колонка) и собирательные трубочки (правая колонка) у интактных животных (А-В) и при введении терапевтических доз Докс (Г-И) и Докс-PLGA (К-П). Окрашивание гематоксилином и эозином

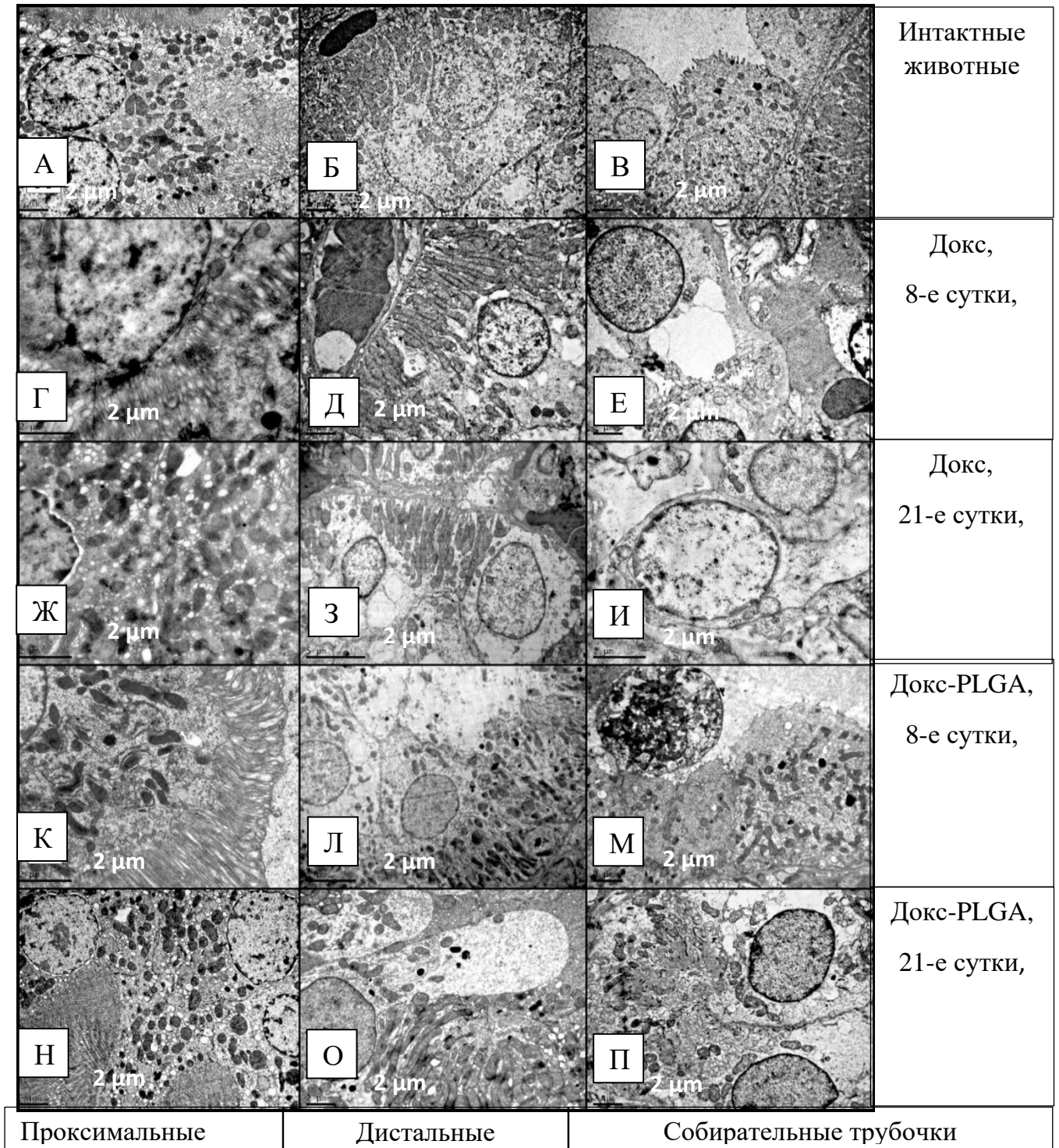


Рисунок 41. А-В – у интактных животных эпителиоциты проксимальных и дистальных канальцев нефрона и собирательных трубочек почки имеют нормальное строение, просветы свободные. Г, Ж – повреждение щеточной каемки в проксимальных канальцах при воздействии Докс. К, Н – эпителиоциты проксимальных канальцев без выраженных изменений при введении терапевтических доз Докс-PLGA. Д, Л – крупные вакуоли в цитоплазме эпителиоцитов дистальных канальцев на 8-е сутки у животных

экспериментальных групп. З, О – разрушение апикальной части клеток (некроз) и заполнение просвета дистального канальца почки фрагментами гибнущих клеток у животных экспериментальных групп на 21-е сутки. Д – вакуолизация цитоплазмы и разрушение митохондрий, И – отек ядра, М – десквамированная клетка в просвете, П – заполнение просвета фрагментами разрушенных клеток в собирательных трубочках животных опытных групп. ПЭМ

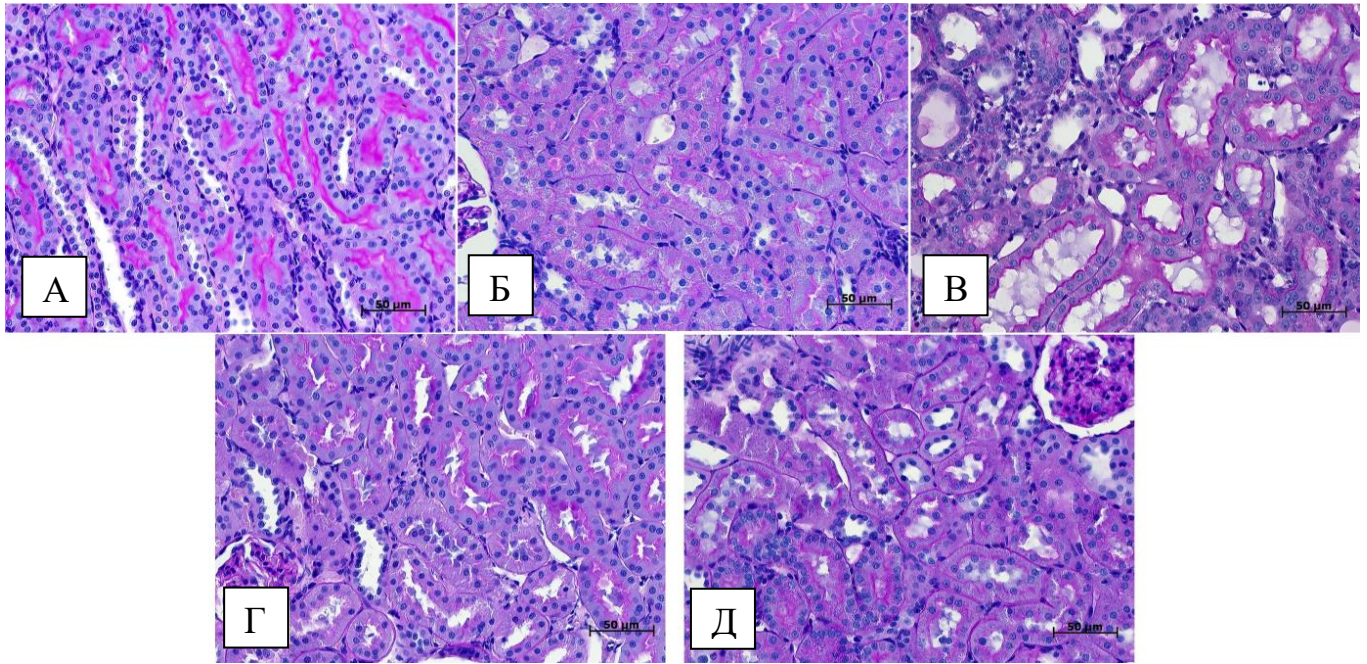


Рисунок 42. Щеточная каемка в проксимальных канальцах почки. Интактные животные (А), после введения терапевтических доз: Докс, на 8-е сутки (Б); Докс, на 21-е сутки (В); Докс-PLGA на 8-е сутки (Г), Докс-PLGA на 21-е сутки (Д). А – интактная группа, щеточная каемка проксимальных канальцев почки определяется 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

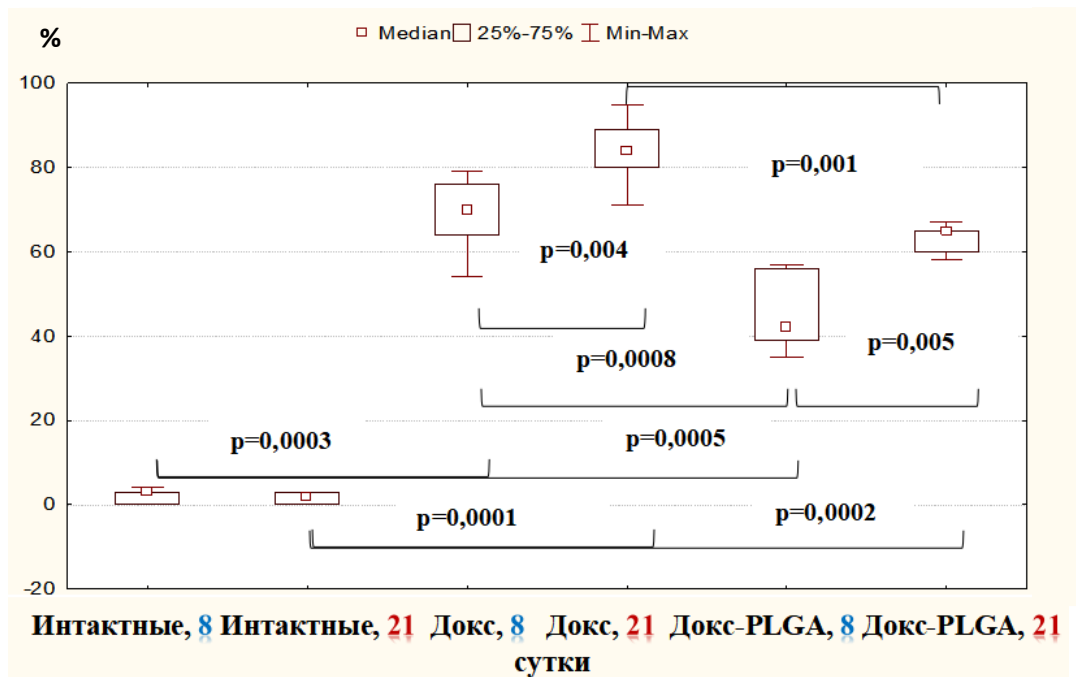


Рисунок 43. Доля проксимальных канальцев нефрона с нарушенной щеточной каемкой у крыс после введения терапевтических доз Докс и Докс-PLGA на 8-е и 21-е сутки

Наше исследование нефротоксичности показало, что после курсового введения терапевтических доз Докс и Докс-PLGA на 8-е и 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. При морфометрии показано, что после введения терапевтических доз как Докс, так Док достоверно выше на 21-е, чем на 8-е сутки. Нефротоксический эффект Докс был статистически значимо более выраженным, чем Докс-PLGA на 8-е и на 21-е сутки.

Таким образом, при введении животным Докс-PLGA патоморфологические изменения в миокарде и печени были менее выражены, чем в группе крыс, при введении Докс. По результатам биохимических исследований наиболее высокие активности ферментов КФК общей и сердечной изоформ, АСТ, АЛТ в сыворотке крови и коэффициент де Ритиса были в группе животных с ГБ без введения ЛП, что связано с интенсивными процессами роста и распада в опухоли на поздней стадии ее развития, а наименьшие в группе животных, которым вводили Докс-PLGA. Нефротоксичность при введении терапевтических доз Докс была более выражена у крыс, чем при введении Докс-PLGA как в ранние, так и более поздние сроки наблюдения.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе проведено сравнительное исследование противоопухолевого действия и токсического эффекта терапевтических доз цитостатика Докс и его PLGA-наноформы на экспериментальной модели ГБ 101.8 крысы. Противоопухолевую эффективность обоих препаратов оценивали с помощью методов экспериментальной онкологии по продолжительности жизни, выживаемости животных, объему опухолей, торможению их роста, а также и по результатам морфологического, гистохимического и иммуногистохимического исследований. Кроме того, с помощью морфологических и биохимических методов проведено исследование кардио-, гепато- и нефротоксичности терапевтических доз Докс и наноформы Докс-PLGA.

В лекарственной форме Докс-PLGA в качестве носителя использованы НЧ на основе полимера молочной и гликолевой кислот, размерами 110 ± 1 нм. Согласно данным Международного союза чистой и прикладной химии IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) НЧ это частица вещества диаметром от 1 до 100 нм или волокна и трубки, длина которых составляет менее 100 нм только в двух направлениях (Vert M. et al., 2012). НЧ входят в состав многих ЛП и широко используются в химиотерапии опухолей. Так липосомы с Докс (Доксил®, Келикс®, Миосет®), применение которых одобрено FDA, позволяют увеличить доставку Докс в ткани опухоли и, в тоже время, снижают их накопление во внутренних органах. Однако терапевтическая эффективность таких ЛВ повышается лишь незначительно (Jain R.K. et al., 2010; Anchordoquy T.J. et al., 2017). Для липосомального Докс характерна дозозависимая токсичность, связанная с развитием тяжелых форм мукозитов и ладонно-подошвенного синдрома (O'Brein M.E. et al., 2004). Липосомальный Докс имеет период полувыведения до 72 часов, тогда как стандартная форма Докс – 10 минут (Symon Z. et al., 1999). По результатам исследований I фазы рекомендованная доза Келикса® составляет до 50 мг/м^2 , тогда как для Докс-PLGA удовлетворительный профиль безопасности и переносимость составил до 90 мг/м^2 (Filon O. et al., 2017), а для стандартной формы Докс его однократная доза составляет до 75 мг/м^2 . Пегилированная (покрытая полиэтиленгликолем) форма Докс, инкапсулированная в липосомы, в 50% случаев, приводит к накоплению Докс преимущественно в коже в результате утечек препарата в капиллярах ладоней и стоп и развитию ладонно-подошвенного синдрома, что ограничивает дозу этого препарата, которую можно вводить

по сравнению со стандартной формой Докс. Поэтому требуется поиск новых форм Докс, для снижения его кардио- и кожной токсичности (Zhu Y., et al., 2020). Противоопухолевый эффект и токсичность ЛВ, заключенных в наноносители, может отличаться от их стандартных форм. PLGA НЧ представляет собой биоразлагаемый полимер сферической формы с низкой системной токсичностью, он одобрен FDA, а также Европейским агентством по лекарствам (EMA) для использования в качестве матриц, несущих ЛВ.

В настоящее время проводятся клинические испытания PLGA мембран с противоопухолевыми веществами (NCT04619056; NCT – number clinical trial, номер клинического исследования, согласно единой базы данных клинических исследований ClinicalTrials.gov, которые финансируются из частных и государственных источников по всему миру). После хирургического удаления опухолей мягких тканей PLGA мембраны с ЛВ помещают в операционное ложе. В клинических исследованиях при раке пищевода PLGA НЧ (NCT04751786) были использованы в качестве носителей иммуномодулирующего средства, состоящего из инвариантного активатора естественных Т-клеток-киллеров – тритолцерамида-б. В качестве вакцины у пациентов с меланомой была применена индивидуальная пероральная форма в виде PLGA таблеток (NCT01753089), содержащих и удерживающих вместе белки и лизаты опухоли пациента, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и олигодезоксинуклеотиды. PLGA НЧ могут защищать антигены от деградации, повышать вероятность того, что они будут представлены иммунным клеткам, и уменьшать побочные токсические эффекты (Gu P. et al., 2019). Так имплантат Ozurdex™, содержащий дексаметазон в твердой полимерной PLGA форме доставки лекарств Novadur® (NCT04082962), медленно разлагается, высвобождая препарат. В настоящее время данная лекарственная форма дексаметазона проходит клинические исследования эффективности у больных с отслойкой сетчатки при увеальной меланоме. Имплантат PLGA с включением гозерелина – Zoladex®, обеспечивает медленное высвобождение ЛП при введении пациентам с гормонально зависимыми опухолями молочной железы и простаты (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2022). Микросферы PLGA Trelstar LA® с гормоном трипторелин памоатом, применяются для лечения опухолей простаты и молочной железы (Dieci M.V. et al., 2022). Микросферы PLGA

Eligard®, Leuprolide acetate®, Durin® содержащие гормон лейпролида ацетат, применяются в лечении опухолевых заболеваний и при болезни Альцгеймера (Abulatefeh S.R., 2022). Гель PLGA Oncogel® с паклитакселом также применяют в качестве противоопухолевого ЛП (Constantinou A.P. et al., 2021).

В нашей работе оценка терапевтического эффекта Докс в составе PLGA НЧ при введении крысам с перевиваемой ГБ 101.8 проведена по показателям СПЖ, УПЖ, ТРО и выживаемости животных в соответствии с методическими рекомендациями Е.М. Трещалиной с соавт. (2012) по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012). Лекарственные формы Докс и Докс-PLGA мы вводили на 2, 5 и 8-е сутки после трансплантации опухоли внутривенно в терапевтической дозе 1,5 мг/кг (3 x 1,5) по Докс. Схема введения ЛП была выбрана на основе результатов токсикологического исследования, которое показало, что суммарная максимальная переносимая доза для НЧ с Докс составляла около 7,5 мг/кг (Gelperina S.E. et al., 2002). Ранее было показано, что после внутривенного введения модифицированных ПБЦА НЧ улучшается биораспределение включенных в их состав Докс (Gulyaev A.E. et al., 1999), лоперамида, даларгина (Alyautdin R.N. et al., 1995, 1997) в головном мозге.

После внутривенного введения модифицированных НЧ с Докс в головном мозге обнаруживаются высокая концентрация Докс, на уровне 6 мкг/г (Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э., 2012). S.C. Steiniger et al. (2004) показали, что введение как Докс, так и Докс-ПБЦА животным с ГБ 101.8 увеличивало медиану выживаемости животных при режиме введения 3 x 2,5 мг/кг по сравнению с режимом 3 x 1,5 мг/кг, доля выживших до 180 дней животных была одинаковой для сравниваемых режимов и составила около 20 %, однако только при режиме 3 x 1,5 мг/кг 20 % животных прожило более 180 дней (Steiniger S.C. et al., 2004).

В нашей работе, по сравнению с Докс, выявлена более высокая противоопухолевый эффект Докс-PLGA. У крыс с ГБ 101.8, которым вводили Докс-PLGA, увеличилась продолжительность жизни, относительно группы животных без введения ЛП на 84 % и относительно группы Докс на 59 %. Только в группе крыс, которым вводили Докс-PLGA, выжили 22 % животных. Установлена обратная зависимость между средней продолжительностью жизни животных и размерами опухолей. Полуколичественный критерий оценки терапевтической активности (Т/С)

Докс-PLGA на основании СПЖ составил 184 % (+++), а излечились менее 50 % животных (полная ремиссия, отсутствие признаков опухоли в течение 100 суток, что подтверждено результатами патоморфологического исследования), и 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. Аналогичные результаты по более высокой противоопухолевой эффективности лекарственных форм, в которых в качестве носителя использованы НЧ, в том числе PLGA, относительно их стандартных форм представлены в работах S.T. Mirakabad et al. (2014), M. Kutwin et al. (2017), O. Esim et al. (2020), N. Brandhonneur et al. (2021) и др.

Считают, что механизм противоопухолевого действия Докс-PLGA может реализовываться за счет адсорбции аполипопротеина Е на поверхности НЧ в крови, что способствует их взаимодействию с рецепторами на поверхности эндотелиоцитов в сосудах головного мозга, преодолению ГЭБ и их накоплению в тканях опухоли (Kreuter J., 1995). НЧ и макромолекулы имеют тенденцию накапливаться в опухолевой ткани гораздо больше, чем в нормальных тканях организма, этот явление называют эффектом повышенной проницаемости и удержания – EPR. Несовершенство структурной организации сосудистого русла и нехватка эффективного лимфодренажа в опухолевых тканях способствуют реализации данного эффекта (Maeda H., 2012).

Однако в ряде работ большая эффективность наноформ ЛВ, по сравнению с их стандартной формой, не подтверждена. Так Wilhelm et al. (2016) проанализировали литературу по носителям ЛВ на основе НЧ и показали, что только 0,7% (медиана) доз вводимых НЧ были доставлены в солидную опухоль, а F. Danhier (2016) сообщил, что эффект EPR в опухолях определяется только у грызунов, но не у человека.

Остается неясным вопрос почему выжило 22% животных, которым вводили Докс-PLGA. Возможно, дис/функциональное состояние иммунной системы и ее ответ на опухоль или лечение у выживших животных отличались от таковых у тех, кто не выжил. Известно о направленной миграции стволовых клеток (СК) в области повреждения ЦНС, а также в опухоли. Лактат в тканях опухоли привлекает мезенхимальные СК. Численное превосходство СК над клетками опухоли способствует их противоопухолевому действию. Среди всех типов клеток ГБ, СК ГБ индуцируют наиболее выраженную

миграцию нормальных СК (Брюховецкий И.С. с соавт., 2016) в опухоль. СК могут уменьшать пролиферативную активность клеток опухоли, в том числе опухолевых СК, запускаются процессы гибели и воспаления (Брюховецкий И.С. с соавт., 2016). В нашей работе моделирование ГБ 101.8 связано с травмой ЦНС при трансплантации тканей опухоли.

Таким образом, у выживших животных, возможно, уже на начальных этапах лечения пролиферативная активность опухолевых клеток сдерживалась не только за счет терапии, но и в ответ на миграцию СК. Видимо, данные процессы происходят одновременно или же один предшествует другому, в результате чего опухоль полностью регрессирует.

В клинической онкологии одним из методов оценки структуры и размеров опухоли в процессе лечения является МРТ. В экспериментальной онкологии более достоверный метод – морфологическое исследование опухоли, позволяющее детально охарактеризовать ее терапевтический патоморфоз. Различные подходы к оценке лечебного патоморфоза в зависимости от степени морфологических изменений/повреждений опухоли были изложены в работах Г.А. Лавниковой (1976; 1979), Е.Ф. Лушниковой (1976; 1977), Н.А. Краевского (1977), А.Ю. Абросимова с соавт. (2021). Патоморфоз опухоли определяется уменьшением ее объема, снижением плотности ее клеток (соотношение строма/паренхима), дистрофическими изменениями опухолевых клеток, появлением и большим количеством гигантских клеток, снижением пролиферативной активности и увеличением гибели клеток, распространением некроза и фиброза. Наряду с классическими признаками патоморфоза также определяют молекулярно-биологические характеристики, рецепторный статус, анеуплоидию, полиплоидию и др. Кроме того, отмечают такие изменения тканей опухоли в процессе лечения, как кровоизлияния, отложения гемосидерина, скопления гемосидерофагов, очаги воспалительной инфильтрации (Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю., 2001; Сазонов С.В. с соавт., 2016). При острых лейкозах, нейробластомах после проведения нескольких курсов химиотерапии осуществляется цитологическое, иммунофенотипическое и молекулярно-биологическое исследование опухоли с целью определения ее чувствительности к проводимой терапии и ее последующей коррекции. В ответ на терапию опухоли могут полностью регрессировать или прогрессировать, а также в них

могут возникать слабые, умеренные и выраженные патоморфологические изменения, появляться признаки псевдопрогрессии. Патоморфологические исследования рекомендовано проводить при доклинической оценке противоопухолевой активности и токсичности новых ЛП. Однако их возможности используются далеко не в полной мере (Сазонов С.В. с соавт., 2016). Патоморфологические исследования могут выявить взаимосвязь между структурой и активностью фармакологического средства, а также позволяют решить проблемы выбора оптимальной лекарственной формы. Новые лекарственные формы ЛВ могут отличаться от их стандартной формы по активности, которую невозможно определить в функциональных тестах (Сазонов С.В. с соавт., 2016). На морфологическом уровне ответ опухоли на терапию с признаками регрессии новообразования после химиотерапии характеризуется такими признаками как некроз, фиброз, пенистые гистиоциты, гигантские клетки, отек, сосудистые изменения в опухоли (Chang F, 2008). Размер злокачественной опухоли, в том числе ГБ, оставшейся после резекции, является значимым независимым прогностическим фактором (Im W.J. et al., 2012; Bette S. et al., 2018; Abedi A.A., et al., 2021). Прижизненная визуализация, оценка размеров и сроков роста различных опухолей при воздействии ЛВ проводится с помощью ультразвукового исследования, КТ и МРТ (Терновой С.К. с соавт., 2006; Palpan F.A. et al., 2020). Применение этих методов для прижизненной оценки размера опухолей у лабораторных животных ограничено из-за высокой стоимости, малой доступности оборудования и относительно невысокого разрешения (2–3 мм) (Eichoff U., 2003). В экспериментальной онкологии оценивают размеры опухолей, в основном, постмортально. Если опухоль сферическая измеряют максимальные размеры опухолевого узла в трех перпендикулярных проекциях. Для вычисления объема применяют соответствующие формулы (Автандилов Г.Г., 1990, 1981; Мхитаров В.А. 2007; Миронов А.Н., 2012; Pineda V. et al., 2019). Также для оценки терапевтического эффекта противоопухолевой терапии определяют массу опухоли, которая положительно коррелирует с ее объемом (Reno T.A. et al., 2016; Kim M.H. et al., 2021). Однако в большинстве случаев форма опухоли не сферическая и размеры, полученные при их измерении, далеки от истинных. Поэтому в ходе нашей работы возникла необходимость применения пространственных моделей биологических объектов с помощью компьютерных программ - JRC 3D - Reconstructor (Gexcel Software Solution), 3D-Doctor

(Able Software Corp) и другие (Eichhoff U., 2003.; Мхитаров В.А. 2007; Nekmatara I. et al., 2009). В отличие от других исследователей, оценивавших эффект лечения экспериментальных 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 окрашенным серийно-ступенчатым фронтальным срезам головного мозга, что позволило получить точные показатели объема опухолей и ТРО. Для расчета размеров опухолей нами была использована программа Image-Pro Premiere 3D (Media Cybernetics, США). В работах I. Nekmatara et al. (2009), А.С. Халанского с соавт. (2011), показано, что лекарственный патоморфоз экспериментальной ГБ 101.8 у крыс Вистар при введении Докс и его наносомальной формой, характеризуется уменьшением размеров опухоли и степени ее васкуляризации (Халанский А.С. с соавт., 2013), распространенности некроза, снижением пролиферативного индекса.

В нашей работе медиана объема ГБ 101.8 в группе крыс без введения ЛП была 95,8 мм³, у животных, которым вводили Докс – 12,9 мм³, в группе Докс-PLGA – 2 мм³. Торможение роста опухоли (ТРО) и Т/С составили 75,6 % и 93,6 %; 13,5 и 8,4 соответственно. Объемы опухолей во всех экспериментальных группах животных значительно варьировали. В каждой группе были как микроопухоли, так и небольшие и большие новообразования. В группах животных без введения ЛП и при введении Докс опухоли были главным образом больших размеров, а у животных, которым вводили Докс-PLGA, преобладали микро- и небольшие новообразования. Vlipova E.V. et al. (2018) показано, что максимальная терапевтическая доза Докс подавляла рост опухоли легких у мышей более, чем на 50% на 7-ые сутки наблюдения, однако, противоопухолевое действие максимальной терапевтической дозы препарата усиливалось к 14-м суткам, ТРО составило более 50% как у животных, при введении максимальной терапевтической дозы препарата, так и среднюю.

Таким образом, по данным волюмометрической оценки размеров опухолей Докс-PLGA оказывал выраженный терапевтический эффект, размеры опухолей были меньшими по сравнению с животными без введения ЛП. На основании статистического анализа 3D-размеров опухоли ГБ 101.8, которым вводили Докс и Докс-PLGA, можно сделать вывод, что наибольший эффект подавления роста опухоли наблюдался при введении животным Докс-PLGA. Наши данные согласуются с результатами

исследований O. Maksimenko et al. (2019), S. Caban-Toktas et al. (2020), N. Norouzi et al. (2021), в которых PLGA наноформы с противоопухолевыми веществами – Докс, R-флурбипрофен, паклитаксел, салиномицин также более эффективно тормозили рост ГБ по сравнению с их стандартной формой.

Возможно, Докс в составе полимерных НЧ позволяет преодолевать множественную лекарственную устойчивость, обусловленную белками P-gp, MDRP, BCRP и другими, что приводит к накоплению Докс в тканях опухоли в высокой концентрации, что повышает его противоопухолевый эффект (Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э., 2012). В работе М.В. Ерохиной с соавт. (2018) показано, что НЧ с противотуберкулезным препаратом – рифампицином, блокировали выброс родамина 123 в линии миелоидных клеток человека K562/i-S9 K562 с повышенной экспрессией MDR1 и Pgp. Ранее А.Е. Gulyaev et al. (1999) показали, что концентрация Докс в головном мозге у здоровых животных повышается, если его включить в состав ПБЦА-НЧ. J. Kreuter et al. (2008) и S. Gelperina et al. (2010) на модели ГБ 101.8 также выявили высокую противоопухолевую активность Докс-ПБЦА, которая проявлялась в увеличении продолжительности жизни и выживаемости животных. S. Wohlfart et al. (2009) показали, что при увеличении числа инъекций Докс в составе ПБЦА НЧ (5x1,5 мг/кг) до пяти (2, 5, 8, 16 и 20-е сутки) увеличивалась продолжительность жизни животных с ГБ 101.8, уменьшались площадь опухоли, индекс пролиферации клеток, площадь некрозов и сосудистой сети. Полученные нами результаты по высокому противоопухолевому эффекту Докс в составе PLGA-НЧ согласуются с экспериментальными данными указанных авторов.

При морфологическом исследовании опухолей животных, которым вводили Докс-PLGA, по сравнению с крысами без введения ЛП в них реже определялись некрозы, среди опухолевых клеток было больше с признаками гибели, чаще определялись гигантские клетки. В группах животных, которым вводили как Докс, так и Докс-PLGA, выявлены признаки лекарственного патоморфоза: опухоли реже прорастали стенки правого желудочка головного мозга, в меньшем количестве опухолей обнаружены некрозы. В ГБ 101.8 всех всех групп опухолевые клетки были с выраженной атипией, ядра клеток были гиперхромными, полиморфными по форме и размерам с выраженными ядрышками. Среди митозов были выявлены патологические формы: концентрические, ассиметричные

и колхициноподобные митозы, полая метафаза. Определялось много клеток с признаками гибели – с кариопикнозом и фрагментацией ядра, клеток теней с нечеткими контурами, слабо базофильным ядром и вакуолизированной цитоплазмой. После введения обеих форм препаратов у части крыс появились крупные, многоядерные клетки – «терапевтические гиганты», увеличивалось число клеток с признаками гибели, уменьшалось число сосудистых розеток. Многоядерные клетки опухоли были крупными, содержали несколько ядер.

Известно, что с нарастанием степени злокачественности опухоли увеличивается число митозов и их патологических форм. В результате аномальной сборки митотического веретена деления клеток опухоли, появляются патологические формы митоза, что приводит к генетической нестабильности (Caracciolo V. et al., 2010). Химиотерапия способствует повышению ploидности клеток опухоли. Так в нашем исследовании только при введении крысам с ГБ 101.8 Докс и Докс-PLGA появились крупные многоядерные клетки с крупными ядрами – «терапевтические гиганты». Скорость деления клеток опухоли может уменьшаться за счет локального увеличения плотности клеток, в ответ на силу внешнего сжатия или удержания. Клеточный цикл также может реагировать на механическое напряжение при участии факторов транскрипции YAP и TAZ между цитоплазмой и ядром при участии сигнального пути Hippo (Yan H. et al., 2022). Для злокачественных опухолей, в том числе ГБ, характерна интенсификация как пролиферации, так и апоптотической гибели клеток (Baba A.I., et al., 2007). В опухоли могут быть спонтанные некрозы и апоптоз, не связанные с проведенной химиотерапией, с градиентным характером распределения изменений – их выраженность постепенно убывает от центра к периферии опухоли (Сазонов С.В. с соавт., 2016). Известно, что апоптотически гибнущие клетки опухоли парадоксально способствуют ее росту, приобретению мезенхимально-эпителиального фенотипа выживших клеток ГБ и устойчивости опухоли к химио- и радиотерапии (Anchoroquy T.J. et al., 2017; Pavlyukov M.S. et al., 2018). Одним из признаков опухоли является устойчивость ее клеток к разным типам гибели, включая апоптоз, некроптоз, аутофагию, ферроптоз и др. (Hanahan D. et al., 2011; Gwennan A.G. et al., 2021; de Souza et al., 2022). Апоптотические клетки генерируют сигналы, стимулирующие пролиферацию индуцированную апоптозом, за счет продукции простагландина E2, ключевого регулятора роста опухоли. Рецидив опухоли после

терапии возникает из-за обратимого пути апоптоза, состояние покоя клеток опухоли (полиплоидия, многоядерность и/или старение), а также образования микроядер в результате нарушения генома, сложной стратегии выживания клеток опухоли (Mirzayans R. et al., 2020). Каспаза-независимая клеточная гибель (Zhang L. et al., 2017), в отличие от каспаза-зависимой, не вызывает пролиферативного ответа в клетках меланомы (Roumane A. et al., 2018) и ее активация может рассматриваться как альтернатива при лечении пациентов с резистентными опухолями.

Опухоли используют стратегии обхода апоптоза такие как потеря функции гена супрессора опухоли *TP53*, повышенная экспрессия антиапоптотических регуляторов (*Bcl-2*, *Bcl-xL*) или сигналов выживания (*Igf1/2*), подавления проапоптотических факторов (*Bax*, *Bak*, *Bim*, *Puma*) или блокирование сигналов от внешнего лиганда пути смерти, что коррелирует с прогрессией опухоли и выживаемостью пациентов с ГБ. Уменьшение количества FAS-рецепторов на поверхности опухолевых клеток или нарушение связывания этих рецепторов с их лигандами нарушает механизм апоптоза. Также показано, что и эпигенетическая дисрегуляция опосредует устойчивость к гибели клеток опухоли, в том числе и к антрациклиновой терапии (Senga S. S. et al., 2021).

Некроз способствует провоспалительным сигналам, привлекающим иммунные клетки с проопухолевым действием. Предполагают, что опухоли с некрозами имеют преимущество в прогрессии так как при этом образуются факторы роста (Hanahan D. et al., 2011; Gwennan A.G. et al., 2021; Lugowska I., et al., 2022; de Souza et al., 2022). Независимо от наличия или отсутствия некрозов в опухоли у пациентов с астроцитомой IDH-мутант, 4 степени ВОЗ с наличием мутации в одной из рецепторных киназ – *CDKN2A/B* также прогнозируется крайне неблагоприятный исход, как и при ГБ без мутации IDH 1/2 и с наличием некрозов. Для ГБ характерно, в подавляющем большинстве случаев, наличие мутации *CDKN2A/B* (Louis D.N. et al., 2021).

Противоопухолевая терапия может вызывать окислительный стресс и гибель клеток как самой опухоли, так и окружающих тканей, что приводит к высвобождению в межклеточное пространство окисленной внеклеточной ДНК, которая индуцирует перестройку генома и транскриптома, с активацией анти-апоптотического процесса и резистентности к лечению ГБ у человека (Назаретян А. Ш. с соавт., 2020). М.Р. Nikitin (2023) показал важность низкоафинных взаимодействий некомплементарных

одноцепочечных ДНК в регуляции генов, которые могут быть ключом к снижению нецелевых терапевтических эффектов.

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).

Клетки «монстры» или терапевтические гиганты являются агрессивной субпопуляцией полиплоидных гигантских клеток опухоли, их высокий пролиферативный потенциал способствует рецидиву опухоли. Данные клетки способны асимметрично делиться амитозом – неосис, когда генетический материал злокачественной клетки отделяется путем почкования от ее ядра до цитокинеза и образования дочерних клеток, это приводит к появлению новых популяций, которые сами способны дифференцироваться в новые типы клеток и восстанавливать опухоль. Таким образом, опухоли, которые избегают стрессоров с помощью этого механизма, 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).

В нашем исследовании у большинства животных ГБ 101.8 прорастала стенку бокового желудочка головного мозга и частично заполняла его просвет, а у части – эпендимальную выстилку не нарушала. При росте ГБ у человека эпендимальная выстилка, а также и структуры внеклеточного матрикса субвентрикулярной зоны головного мозга нарушаются. При локальной инвазии клеток ГБ в стенку желудочка головного мозга увеличивается приток ликвора в ткани ГБ. Наряду с физическим разрушением опухолью эпендимального клеточного барьера, в эпендимоцитах накапливаются липидные капли, уменьшается высота и количество ресничек, а также снижается экспрессия белков клеточных каналов – аквапорина-4 (AQP4), который выводит воду из клетки (Hubbard J. A. et al., 2015), при повреждениях ЦНС показана их важная роль в дисбалансе воды в мозге (Okłinski M.K. et al., 2016). При этом повышается количество мелких фрактонов – структур, состоящих в основном из ламинина, расположенных во внеклеточном матриксе субвентрикулярной зоны боковых желудочков головного мозга, которые участвуют в нейрогенезе у взрослых, глиогенезе и ангиогенезе. Повышенное количество мелких фрактонов указывает на выраженную

непрямую передачу сигналов клеткам ГБ молекулами, содержащимися в спинномозговой жидкости (Norton E.S. et al, 2022). На моделях опухолей головного мозга при внутримозговой инфузии физиологического раствора у мышей с дефицитом AQP4 наблюдалась более тяжелая гидроцефалия, повышенное внутричерепное давление, ограниченное выведение воды и более тяжелое неврологическое состояние в отличии от группы сравнения (Okłinski M.K. et al., 2016). Показано, что на границе между опухолью и тканью головного мозга выражена экспрессия ламинина. В перитуморальной зоне у крыс выявлен сетчатый, периваскулярный и перичеллюлярный отек, как описано и при ГБ у человека (Johnson P.J. et al., 2022). Клетки ГБ могут продуцировать компоненты базальной мембраны, такие как ламинин, витронектин, фибронектин, тенасцин С, коллаген I, IV, VI типов, что может способствовать их инвазии и метастазированию. Также пути распространения клеток ГБ, такие как миелинизированные волокна аксонов, базальная мембрана сосудов и их адвентиция, содержат эти же волокнистые белки – коллаген, фибронектин, ламинины и витронектин (Seker-Polat F. et al., 2022).

По данным морфологического исследования, клетки ГБ 101.8 инфильтрируют прилежащие ткани головного мозга, распространяясь периваскулярно и перинейронально. Опухолевые клетки в пограничной зоне образовывали скопления вокруг сосудов и нейронов с признаками гибели последних. Вокруг нейронов они нередко формировали железистоподобные структуры. ГБ человека также имеет выраженный инвазивный рост в ткани головного мозга.

Нейроны, вокруг которых были локализованы клетки ГБ 101.8 находились в состоянии дегенеративных изменений и нередко были представлены «клетками-тенями». Перинейральная инвазия связана с неблагоприятным прогнозом при опухолях поджелудочной железы, клетки опухоли рекрутируют нервы через фактор роста нервов, способствуя дальнейшей иннервации опухолевых клеток – аксогенезу, увеличивается накопление норадреналина в тканях опухоли, индуцируется β 2-адренергическая активность (Senga S. S. et al., 2021). Нейрональная передача сигналов являются неотъемлемой частью онкогенеза, она влияет на микроокружение опухоли, пролиферацию, метастазирование, тонус кровеносных сосудов и их кооптацию, а также на экспрессию молекул иммунных контрольных точек – систему ингибиторных механизмов, регулирующих активацию иммунного ответа (Senga S. S. et al., 2021).

Поскольку химиотерапия может нарушать существующие взаимодействия между нейронами, глиальными и опухолевыми клетками, которые стимулируют рост опухоли, возможно, Докс в PLGA НЧ более эффективно повреждает не только клетки опухоли, но и нейроны и глиальные клетки, образующие сеть в опухоли и вокруг нее, что также тормозит ее рост.

Во всех опухолях ГБ 101.8 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 пролиферацией эндотелия с частично сформированной стенкой из эндотелия и хорошо визуализируемых волокон. Кроме того, сосуды образовывали скопления 3-5 сосудов – «сосудистые розетки», скопления эндотелиальных клеток. Эндотелий формировал гломерулоподобные скопления сосудов, что также описано и при ГБ у человека (Scherer H.J., 1938). Визуализируемое при МТР внутриопухолевое контрастное усиление, является результатом неоангиогенеза в ГБ. Хаотично сформированное сосудистое русло местами содержит артериовенозные шунты и множественные фенестрированные или прерывистые капилляры и венулы, что способствует повышению проницаемости сосудов. Взаимодействие между опухолевыми клетками и кровеносными сосудами способствует росту опухоли. Ангиогенез опухоли, в отличие от заживления ран, нарушается из-за персистенции проангиогенных сигналов, поэтому сосуды опухоли достаточно гетерогенны, с неравномерным и хаотичным кровотоком, могут быть тупиковыми и проницаемыми (Yashin K.S. et al., 2016), как и в ГБ 101.8. Описаны разные пути васкуляризации при ГБ. Находящиеся в условиях гипоксии опухолевые клетки, окружающие область некроза, продуцируют VEGF и фактор роста фибробластов 2 (FGF2), которые стимулируют «отпочковывание» новых капилляров от предсуществующих кровеносных сосудов – прорастающий ангиогенез. При инвагинационном ангиогенезе формируются транслюминальные тканевые столбы внутри существующих сосудов, которые сливаются и в них происходит реконструкция сосудистого русла (Lugowska I., et al., 2022). При васкулогенезе в опухолях кровеносные сосуды образуются *de novo* при рекрутировании предшественников эндотелиальных, мезенхимальных клеток или гемопоэтических клеток костного мозга, мигрирующих из системного кровотока в ГБ и ангиогенез в этом случае инициируется такими факторами,

как VEGF и – хемокины CCL2 и CCL5. Первичные и метастатические опухоли, в том числе ГБ, могут развиваться и прогрессировать в отсутствие ангиогенеза (Wesseling P. et al., 1994). Предполагают, что в процесс васкуляризации опухоли часто вовлечен механизм, свойственный только для тканей опухоли, такой как кооптация (Civita P. et al., 2020), когда опухолевые клетки захватывают существующую сосудистую сеть органа-хозяина и мигрируют по ходу кровеносных сосудов. При сосудистой мимикрии стволовые клетки ГБ формируют трубчатые/сосудистые структуры без участия эндотелиоцитов. Стволовые клетки ГБ способны трансдифференцироваться в эндотелиальные клетки и перициты опухоли (Donnem T. et al., 2013). Известно, что эндотелиоциты и перициты, выстилающие сосуды опухоли, имеют те же опухолеспецифические генетические аномалии, например, амплификацию EGFR или мутацию TP53, что и соседние клетки опухоли. Отмечено, что эндотелиальные клетки опухолевого происхождения распространены в центральной области ГБ и реже встречаются на ее периферии. Рост кровеносных сосудов путем кооптации предсуществующих сосудов в ГБ может быть вызван антиангиогенной терапией (di Tomaso E. et al., 2011). В опухоли могут одновременно происходить процессы ангиогенеза и кооптации. Кооптированные сосуды реконструируются окружающей опухолевой тканью и поэтому не всегда могут выглядеть как нормальные кровеносные сосуды. Кооптированные сосуды опухоли могут сохранять морфологические и молекулярно-биологические характеристики эндотелия сосудов головного мозга, например, экспрессию GLUT-1 и P-gp. Поэтому, возможно, в нашей модели ГБ 101.8 есть участки опухоли с кооптированными сосудами и относительно низкой экспрессией P-gp, где Докс-PLGA НЧ эффективней проникают в ткани опухоли. Кооптация сосудов была впервые выявлена в опухолях человека, однако было также показано, что экспериментальные модели на мышах повторяют паттерны роста, наблюдаемые в опухолях человека. Показано, что в метастазах опухоли молочной железы у мышей в легких развиваются только неангиогенные метастазы с кооптацией сосудов. Тогда как в метастазах легких при опухоли почки у мышей образуются как ангиогенные, так и кооптирующие сосуды. Негерметичность и сужение просвета сосудов опухолью оставляет большие объемы ткани без кровотока и препятствует доставке переносимых с

кровью ЛВ, кислорода и питательных веществ, что приводит к развитию ишемии и некроза опухоли (Ahir B.K. et al., 2020).

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 они располагались в периферических и центральных ее областях. Экспрессию GFAP обнаруживают в клетках глиобластомы 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. с соавт., 2010).

В ГБ 101.8 часто обнаружены 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. ГБ IDH-дикого типа характеризуются некротическим центром соломенного цвета, желтоватыми пятнами, которые связаны с разрушением миелина, и кровоизлияниями (Alaverdyan A.E. et al., 2021). Показано, что в ГБ перициты расположены только на 10-20% площади наружной стенки сосудов опухоли (Segura-Collar B. et al., 2021). Недостаток перицитов вызывает повышенную регуляцию VEGF, что увеличивает проницаемость сосудов и приводит к кровоизлияниям (Segura-Collar B. et al., 2021). По данным С. Mantia et al. (2017) у пациентов с ГБ часто возникают внутричерепные кровоизлияния, ГБ является одной из наиболее «протромботических» опухолей, более чем у 30 % пациентов диагностируется венозная тромбоэмболия, ассоциированная с опухолью (Weinstock M.J. et al., 2016). Многие опухоли, в том числе ГБ, продуцируют факторы, которые поступают в системный кровоток и усиливают свертываемость крови: муцин, подоплаин, тканевой фактор тромбоцитов, гепараназу, провоспалительные цитокины, прокоагулянтные и фибринолитические факторы, за счет лейкоцитоза увеличивается количество

нейтрофильных внеклеточных ловушек, действующих как инициаторы сосудистых коагулопатий (Campello E. et al., 2019; Thakur M. et al., 2021). У онкологических пациентов, в том числе с опухолями ЦНС, повышен риск сердечно-сосудистых патологий таких как инсульты, инфаркты, сердечно-сосудистая недостаточность, тромбоэмболия легочной артерии, риск смерти от них возрастает по мере роста стадии заболевания и сохраняется в течение 10 лет от постановки онкологического диагноза (Paterson D.I. et al., 2022).

У части исследованных нами крыс в серийных ступенчатых срезах был выявлен только глиальный рубец, распространяющийся от коры головного мозга до паравентрикулярной зоны, в зоне рубца у отдельных животных были обнаружены единичные опухолевые клетки и их небольшие скопления. Реактивный астроглиоз связан со многими патологическими процессами в ЦНС. ГБ вызывают астроглиоз и образование рубцов (Campbell S.C. et al., 2020). Глиальный рубец содержит отдельную популяцию реактивных астроцитов, которые происходят из нейральных стволовых клеток и оказывает нейропротекторное действие (Kolar K. et al., 2015). Сложное взаимодействие реактивных астроцитов и клеток микроглии в ГБ способствует созданию иммуносупрессивной среды, предполагая, что астроциты, связанные с опухолью, способствуют противовоспалительным реакциям и росту аксонов (Henrik Heiland, D. et al., 2019). Показано, что глиальный рубец, который образовался через 2 недели вокруг опухоли имплантированной в головной мозг мыши может способствовать химиорезистентности опухоли (Pustchi S.E. et al., 2020). Хотя большинство ГБ развиваются без идентифицируемого провоцирующего события, известно, что ГБ, могут возникнуть из участков глиальной рубцовой ткани после травмы головного мозга, хирургической резекции или инфаркта мозга. Однако эпидемиологические исследования не показали существенной связи между образованием ГБ и повреждениями ЦНС. Поэтому предполагается существование сопутствующего дополнительного агента, участвующего в онкогенезе. Экспериментальные исследования показали, что внутримозговая травма может действовать как сопутствующий фактор в присутствии иницирующего канцерогена. На модели внутримозговой травмы у крыс воздействие мощного нейроканцерогена увеличивало темпы образования ГБ (Okolie O. et al., 2016; Matsumoto H. et al., 2016).

Таким образом, выявленные при морфологическом исследовании особенности ГБ 101.8 у крыс соответствуют основным критериям ГБ человека (Авцын А.П. с соавт. 1988), которая также характеризуется высокой атипией опухолевых клеток, наличием большого количества кровеносных сосудов с образованием розеток и очаговой сосудистой пролиферацией, палисадообразных некрозов и кровоизлияний. При введении животным с ГБ 101.8 Докс-PLGA, по сравнению с крысами без введения ЛП размеры опухоли были меньше, в них реже определялись некрозы, было больше клеток с признаками гибели, среди опухолевых клеток чаще определялись гигантские клетки. При морфологическом исследовании ГБ 101.8 при введении животным как Докс, так и Докс-PLGA выявлены признаки патоморфоза опухоли в ответ на терапию – меньшие размеры опухолей, их меньшая частота прорастания стенки правого желудочка головного мозга, меньшее количество опухолей с некрозами. После введения ЛП среди опухолевых клеток появились крупные, многоядерные клетки – «терапевтические гиганты», увеличилось число клеток с признаками гибели и снизилось число сосудистых розеток. Однако, на качественном уровне признаки лекарственного патоморфоза ГБ 101.8 у животных, которым вводили 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.

Основные фенотипических изменения, которые мы можем наблюдать в качестве клеточных реакций на ЛВ – пролиферация и гибель клеток, ЛВ могут специфически их стимулировать или угнетать. Терапия динамически изменяет существующий баланс деления/гибели – обновление клеток опухоли, а также меняет их типы (Вае, S.Y. et al., 2020).

В группах животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA, лекарственный патоморфоз опухоли морфологически проявлялся изменением кинетики опухолевого роста – баланса пролиферативных процессов и гибели опухолевых клеток. В обеих исследованных группах, при введении Докс и Докс-PLGA животным, по сравнению с крысами без введения ЛП, количество митозов в репрезентативных полях зрения было меньше, но статистически значимых различий не было обнаружено. Пролиферация – ведущий процесс, восстанавливающий число клеток опухоли после повреждения. При регенерации есть так называемый латентный период пролиферации, который

характеризуется тем, что сразу после повреждения наблюдается наибольшее количество пролиферации, которое затем постепенно снижается. В ГБ у человека разные области опухоли имеют разное количество фигур митоза (Louis D.N. et al., 2021).

По нашим данным количество Ki67-позитивных клеток в ГБ 101.8 у крыс было статистически значимо ниже в группе животных, которым вводили Докс-PLGA, чем без введения ЛП, что согласуется с исследованиями S. Steiniger et al. (2004), I. Nekmatara et al. (2009), S. Wohlfart et al. (2009), S. Wohlfart et al., (2011).

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). НЧ способны преодолевать биологические барьеры, проникая через мембраны клеток путем эндоцитоза, фагоцитоза, и взаимодействовать с клеточными компартментами, включая белки, липиды и геномную ДНК (Shalviri et al., 2012; Wang et al., 2018). НЧ размером около 100 нм, такие как липосомы Доксил - 90 нм, Онивид - 110 нм, Амбизом и Амфотек – 100 нм (Vulbake U. et al., 2017), могут легче преодолевать гематоэнцефалический барьер и накапливаться в опухолях, чем НЧ размером 200 нм (Costantino L., 2010). Можно предположить, что существенную роль играет внутриклеточная локализация деградируемых НЧ. Клатрин-опосредованный эндоцитоз показан как основной механизм проникновения PLGA НЧ в клетки ГБ. (Malinovskaya Y. et al., 2017). Нарушение регуляции внутриклеточного рН (pH_i – pH intracellular) и изменения внеклеточного рН (pH_e – extracellular pH) часто встречается при опухолях. Известно, что щелочной внутриклеточный рН способствует синтезу ДНК и пролиферации клеток опухоли, увеличению их числа и объема опухоли (Ward C. et al., 2020). Активная пролиферация приводит к более высокой частоте мутаций в опухолевых клетках, в том числе, связанных с резистентностью, пролиферацией, ингибированием апоптоза, репарацией ДНК, что увеличивает их выживаемость, вызывая прогрессирование заболевания. Так как НЧ PLGA состоят из кислот – молочной и гликолевой, то возможно, НЧ PLGA попадая в клетки опухоли способствуют понижению pH_i , что тормозит пролиферативную активность клеток ГБ 101.8. Кроме того показано, что снижение pH_i клеток опухоли усиливает противоопухолевое действие Докс и гипогликемического средства – метфола (Miraglia E. et al., 2005; Ward C. et al., 2020).

Также существующий порог рН_i, около 7,1-7,2, является предельным ниже которого ферменты теряют свою активность, а факторы роста не могут стимулировать прогрессирование фазы клеточного деления G1 и вступление в клеточный цикл (Ward C. et al., 2020). Показано, что активность и экспрессия Na⁺/H⁺-антипорта, участвующего в поддержании рН_i, увеличивается в резистентных к Докс опухолевых клетках, а уменьшение рН_i клетки, способствует внутриклеточному накоплению Докс, снижая уровень резистентности к нему. Щелочные значения рН_e замедляют высвобождение Докс из НЧ *in vivo* (Kovshova T. et al., 2021). Отмечено, что рН_i в резистентных к цитостатику клетках выше. Кислая среда увеличивает ДНК-связывание с алкилирующим агентом цисплатином, что повышает его противоопухолевую эффективность. Применение ингибитора водородного насоса бафиломицина, способствующего снижению рН_i опухолевых клеток, повышало цитотоксичность цисплатина. Повышение внутриклеточного рН_i способствует переходу клеток опухоли в G2/M (Putney L.K. et al., 2003), таким образом стимулируя клеточную пролиферацию. Предполагают, что снижение рН_i является ранним сигналом для активации каспаз при апоптозе. Цитохром-с-опосредованная активация каспаз требует цитозольного подкисления с наивысшей активностью каспазы при рН_i 6.3-6.8 (Matsuyama S. et al., 2000). С увеличением щелочного рН_i нарастает активность гликолиза, который необходим для выработки энергии быстрорастущими клеткам опухоли (Miccoli L. et al., 1996; Dechant R. et al., 2010). Клетки опухоли поддерживают рН_i частично за счет повышенной активации и экспрессии HIF1-зависимых генов (Pouyssegur J. et al., 2006), которые участвуют в удалении лактата вместе с ионами водорода из опухолевых клеток, или способствует образованию бикарбоната и ионов водорода из CO₂ и H₂O (Rafiyath S.M. et al., 2012). Устойчивость к лечению также связана с кислым рН_e, так как изменяется структура и заряд ЛВ (например, Докс приобретает сильный отрицательный заряд, что ингибирует его поглощение через клеточные мембраны при низком рН_e). Кроме того, наночастицы могут блокировать ионные каналы клеток, также изменяя рН_i, изменять внутриклеточный ионный гомеостаз, сигнальные пути и внутриклеточные концентрации ионов, что приводит к инициации ряда биологических процессов (Yin S., et al., 2019). Ацидоз в тканях опухоли, также повышает устойчивость к апоптозу опухолевых клеток при химио/радиотерапии (Bogdanov A., et al., 2022), что способствует миграции, инвазии,

метастазированию. При этом ингибируется функция иммунных клеток, повышаются уровни VEGF и число клеток с фенотипом стволовых (Ward C. et al., 2020). Химио/радиорезистентность может быть связана с антиоксидантным действием лактата и гипоксией. Поэтому Докс не может в полной мере реализовать один из своих механизмов цитотоксичности, который связан с выработкой АФК, что инициирует перекисное окисление липидов и индуцируют повреждение ДНК. Также поскольку Докс необходима биоактивация в тканях опухоли до семихинонового радикала, для образования АФК, некоторые резистентные опухолевые клетки не могут активировать Докс и АФК не образуются (Sinha B.K., 2020). Большему накоплению в тканях опухоли НЧ PLGA, которые состоят из лактата и гликолида 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).

В глиомах экспрессия Ki67 коррелирует со степенью злокачественности опухоли, что может быть использовано для дифференциальной диагностики, чем она выше, тем злокачественнее опухоль. Индекс Ki67 различается в разных областях ГБ и может варьировать от 5 до более чем 50% (Louis D.N., et al., 2021). Тем не менее, значения Ki67, как независимого прогностического фактора при ГБ, в литературе и клинических рекомендациях пока не установлены (Alkhaibary A. et al., 2018). В работе A. Alkhaibary et al. (2018) показано отсутствие значимости одного только индекса Ki67 (учитывали $\leq 27\%$ против $> 27\%$) в выживаемости пациентов с ГБ. Bastos A.G.P. et al., 2022 установили, что экспрессия Ki67 как в первичных (в среднем 31% опухолевых клеток), так и рецидивирующих ГБ (в среднем 29% опухолевых клеток) была сходной и не имела прогностической значимости. Некоторые исследования показали положительную корреляцию между индексом Ki67 и общей выживаемостью у пациентов с ГБ. Показано, что чем выше индекс Ki67, тем дольше выживаемость (Bredel M. et al., 2002; Wong E. et al., 2018). Это, возможно, связано с тем, что 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), как показано при опухолях легких и молочной железы. Тогда как высокий индекс Ki67 в остаточной опухоли после завершения химиотерапии является неблагоприятным признаком, с большей

вероятностью рецидива (Стрункин Д.Н. с соавт., 2022). Количество Ki67 и активность Топо II альфа-позитивных клетках было ниже у пациентов с ГБ, которые прожили более 2-х лет, по сравнению с пациентами у которых продолжительность жизни была меньше. Поэтому можно предположить, что при эффективном воздействии Докс на клетки ингибитора Топо-II альфа будет снижаться и количество Ki67 положительных клеток. Y. Yoshida et al. (2010) показали, что у пациентов с ГБ выживаемость в течение 1 года составила 77% и 32% для индекса Ki67 $\leq 20\%$ и $\geq 20\%$ соответственно (Alkhaibary A. et al., 2018). С. Henker et al. (2019), D. Armocida et al. (2020) утверждают, что процент окрашивания Ki67 $> 20\%$ предсказывает худшую выживаемость без прогрессирования при ГБ IDH-дикого типа. Была обнаружена значимая положительная связь между индексом Ki67 и размерами зоны отека, что также связано с более низкой выживаемостью (Caramanti R. et al., 2022). В ряде работ не выявлено взаимосвязи между клиническим исходом и индексом пролиферации опухолевых клеток (Dahlrot R.H. et al., 2021), что авторы объясняют широкими различиями в митотической активности между разными зонами опухоли (Alkhaibary A. et al., 2018). Так наибольшее число Ki67 положительных клеток оказалось в периваскулярной области (самый высокий средний индекс Ki67 ($22,23 \pm 1,4\%$)), в перинекротической области ($6,83 \pm 0,5\%$), области некроза ($18,39 \pm 0,56\%$), ($10,68 \pm 0,39\%$) в промежуточной области (Nikitin P.V. et al., 2019). McKeever P.E. et al. (1998) показали, что более молодые пациенты с ГБ имеют лучший прогноз из-за более низких уровней экспрессии индекса Ki67, хотя A. Alkhaibary et al. (2018) в своем исследовании не выявили данную закономерность. Самый высокий уровень экспрессии Ki67 и самый низкий уровень TUNEL-положительных клеток показан на модели мышей с ксенотрансплантированными клетками ГБ человека, которые не получали лечение. Средний уровень экспрессии Ki67 наблюдался в ГБ у мышей, получивших радиотерапию. Самый низкий уровень экспрессии Ki67 и самый высокий уровень TUNEL-положительных клеток был обнаружен в образцах ГБ мышей, получивших НЧ с инкапсулированной плазмидой, кодирующей секретрируемый домен гена фактора роста гепатоцитов 1, нацеленный на рецептор фолата, или его сочетании с радиотерапией (Zhang W. et al., 2018). И.А. Казанцева с соавт., (2014) считают, что индекс Ki67 в карциномах желудка не имеет прогностического значения, что, по всей вероятности,

объясняется неадекватностью этого показателя для оценки биологического потенциала опухолей, развившихся в тканях с постоянно обновляющимися клеточными популяциями.

Отмечена связь экспрессии гена *VEGF* с индексом *Ki67* в гемистоцитарных астроцитомах. Индексу *Ki67*, более 5% (71,4% случаев), соответствовала умеренная пролиферация эндотелия сосудов (85,7%) и средний/высокий уровень экспрессии гена *VEGF*. Тогда как при значениях *Ki67* менее 5%, экспрессия гена *VEGF* был низкой в 100% случаев, а пролиферация эндотелия сосудов отсутствовала (Зрелов А.А. с соавт., 2018).

Ключевым фактором в реакции клеток опухоли на химиотерапию наряду со снижением пролиферативной активности является активация их гибели. Клетки гибнут от воздействия Докс путем митотической катастрофы и апоптоза (Eom Y.W. et al., 2005) некроптоза, аутофагии, ферроптоза, пироптоза (Christidi E. et al., 2021).

В ГБ 101.8 у крыс всех исследованных групп подсчитывали число клеток с признаками гибели в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. 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.

В нашем исследовании показано снижение кинетики опухолевого роста в тканях ГБ 101.8 у крыс, при введении Докс и Докс-PLGA, по сравнению с животными без введения ЛП, коэффициенты клеточного обновления (ККО) в данных группах были ниже. И.А. Казанцева и соавт. (2014) показали, что при опухоли желудка значения индексов *Ki67*, митоза, апоптоза и ККО достоверно связаны с гистологическим вариантом и иммунофенотипом опухоли. Тогда как на прогноз выживаемости влияют только митотический, апоптотический индексы и ККО (И.А. Казанцева, Л.Е. Гаганов. 2014).

S.Y. Bae et al. (2020) показали, что разные противоопухолевые ЛВ могут либо одновременно ингибировать деление и индуцировать гибель клеток, либо ингибировать только деление клеток, либо индуцировать только гибель клеток. При воздействии на клетки опухоли Докс *in vitro*, дозозависимо снижалась скорость пролиферации клеток и незначительно увеличивалась скорость их гибели. Дозы Докс и Докс-PLGA *in vivo* при их системном введении, ограничены токсичностью Докс. Терапевтическая доза может быть сублетальной для некоторых клеток опухоли и не вызывать их гибель. Возможно, происходит активация выживших после терапии клеток опухоли и восполняются потери.

По нашим данным у животных, которым вводили Докс и Докс-PLGA количество сосудов, визуализированных гистохимическим окрашиванием изолектином В4, снижалось относительно группы животных без введения ЛП, но достоверные различия были отмечены только для группы животных, которым вводили Докс. В работах I. Nekmatara et al. (2009), S. Wohlfart et al. (2009), S. Wohlfart et al. (2011) также было показано, что количество кровеносных сосудов на гистологических срезах ГБ 101.8 у крыс было ниже при введении как стандартной, так и наносомальной формы Докс.

Снижение VEGF в опухоли приводит к уменьшению длины незрелых сосудов, их плотности и диаметра, а также перестройку сосудистой сети, которая больше напоминает структуру нормальных сосудов, улучшается перфузия, что восстанавливает градиенты давления на стенки сосудов и приводит к более глубокому проникновению молекул в опухоли и улучшению оксигенации (Stylianopoulos T., 2016). По данным иммуноферментного анализа показатели содержания белка сосудистого фактора роста А (VEGF А) в сыворотке крови у животных без опухоли, животных с опухолью без введения ЛП и при введении Докс и Докс-PLGA не различались. 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). Также многие исследования показывают снижение общей выживаемости и безрецидивной выживаемости у больных с опухолями, гиперэкспрессирующими VEGF. Сверхэкспрессию VEGF А регистрируют на ранней стадии метастазирования. Хотя VEGF А коррелирует с плохой выживаемостью, его точный механизм действия, обуславливающий прогрессирование опухолей, остается неясным.

VEGF А увеличивает проницаемость микрососудов, и он был первоначально назван «Сосудистый фактор проницаемости». Факторы, индуцируемые гипоксией HIF1 α и β стимулируют продукцию VEGF. Показано, что VEGF А высоко экспрессируется в острую и подострую стадии повреждения клеток ЦНС, но экспрессия белка со временем снижается. Многие опухоли продуцируют и ингибирующие ангиогенез факторы, поэтому ангиогенный фенотип ткани определяется балансом между позитивными и негативными

регуляторами неоваскуляризации (Dyhrfort P. et al., 2019; Lugano R. et al., 2020; Haibe Y., 2020; Uemura A. et al., 2021).

Наряду с определением противоопухолевого эффекта лекарственных форм Докс и Докс-PLGA в нашей работе с помощью электронной микроскопии, гистологического, гистохимического и биохимического методов исследованы кардио-, гепато-, и нефротоксические эффекты введения ЛП.

Доксорубин – противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, который оказывает антипролиферативное, антибактериальное действие и широко применяется в онкотерапии. Механизмы его действия заключаются во взаимодействии с ДНК и подавлении синтеза нуклеиновых кислот, образовании свободных радикалов и прямом воздействии на мембраны клеток. Эти же механизмы определяют наличие побочных эффектов Докс. При введении препаратов Докс в стандартной форме отмечается большое количество побочных эффектов преимущественно со стороны органов, имеющих высокий уровень клеточной пролиферации: сердечно-сосудистой системы, крови (кроветворение, гемостаз), ЖКТ, кожи, нервной системы и других (Couvreur P. et al., 1982, Couvreur P. et al., 1986). В экспериментальных исследованиях установлено канцерогенное, мутагенное, тератогенное и эмбриотоксическое действие Докс, кроме того, он является иммуносупрессантом (Anggriani L. et al., 2019). Для снижения общей токсичности и обеспечения целенаправленного действия Докс разрабатываются различные средства для его доставки (клинические испытания – NCT05354076, NCT04852367, NCT04859465, NCT05273944, Couvreur P. et al., 1982, Couvreur P. et al., 1986, Drummond D.C. et al., 1999). Считается, что эффект EPR, когда НЧ и макромолекулы в меньшей степени накапливаются в нормальных тканях организма чем в опухоли, способствует меньшей токсичности НЧ. Сохранность гисто-гематических барьеров, целостность их сосудистого русла и эффективный действующий лимфоотток препятствуют проникновению и накоплению НЧ в клетках нормальных тканей организма (Maeda H., 2012). Токсический эффект НЧ во многом может зависеть от их природы. Так Л.А. Шарафутдиновой (2022) установлено, что при пероральном введении НЧ диоксида титана рутильной формы крысам развивается вторичное иммунодефицитное состояние. Оно характеризуется акцидентальной инволюцией тимуса, редукцией белой пульпы селезенки, что автор

связывает со снижением пролиферативной активности и усилении апоптоза иммунокомпетентных клеток.

Любые злокачественные опухоли, в том числе ЦНС, секретируют в кровь разные биологически активные молекулы, в том числе ростовые, провоспалительные, протромботические факторы, гормоны и другие (Campello E. et al., 2019; Thakur M. et al., 2021), которые у онкологических пациентов могут вызвать развитие паранеопластического синдрома и аутоиммунные реакции (Darnell R.B. et al., 1993; Roberts W.K. et al., 2004; Albert M.L. et al., 2004; Pittock S.J. et al., 2004). У онкологических больных паранеопластический синдром, включающий сердечно-сосудистые, неврологические, гематологические, эндокринные, дерматологические нарушения является причиной смерти в 27% случаев. Так лиганд FAS, экспрессирующийся на поверхности опухолевых клеток, может попадать в кровоток, FAS-лиганд инициирует апоптоз клеток многих органов (Lugowska I. et al., 2022). У онкологических пациентов повышен риск развития сердечно-сосудистых нарушений, ассоциированных с опухолью, в результате которых возникают инсульты, инфаркты, сердечно-сосудистая недостаточность, тромбоэмболия легочной артерии. Риск смерти от этих заболеваний увеличивается в зависимости от степени злокачественности и стадии опухолевого роста и сохраняется в течение 10 лет от начала онкологического процесса (Paterson D.I. et al., 2022). Также паранеопластический синдром может проявляться воспалительными заболеваниями – дерматомиозитами (Vilas A.P. et al., 2000; Cheng H. et al., 2019; Alghanim K.K. et al., 2021) и полимиозитами (Kishore D. et al., 2011). Показано, что дегенерация мозжечка, развивающаяся на фоне прогрессирования опухолевого роста, обусловлена неврологическими аутоиммунными реакциями с выработкой антител, против изоформы КФК клеток головного мозга (Joshi D.D. et al., 2003; Tetsuka S. et al., 2013). Продуцировать КФК способны разные типы опухолей (Chang C.C. et al., 2015; Eidizadeh A. et al., 2019), в результате чего ее высокая активность определяется в сыворотке крови. Для паранеопластического синдрома, в том числе при ГБ, также характерно нарушение секреции антидиуретического гормона (Pelosof L.C. et al., 2010), развитие аутоиммунного нервно-мышечного заболевания – миастении гравис (Slegers R.J. et al., 2022), паралич мышц глазного яблока вследствие поражения глазодвигательных нервов, нефропатии (Dhoot A.S. et al., 2020; Jeyabalan A. et al., 2022; Sardiña González C. et al., 2022).

По нашим данным при морфологическом исследовании тканей сердца у крыс с опухолью без введения ЛП патологических изменений не было выявлено. При введении животным Докс в миокарде обнаружены небольшие очаги некроза, воспалительная инфильтрация гистиоцитами и лимфоцитами, что характерно для острого токсического миокардита. Определялись обширные зоны межучного отека со слабо выраженной диффузной воспалительной инфильтрацией лимфоцитами и гистиоцитами. При лечении животных Докс-PLGA патоморфологические изменения в миокарде были менее выражены, чем в группе крыс, которым вводили Докс. «Золотым» стандартом диагностики миокардита (IV категория) является морфологическое исследование эндомикардиальных биоптатов по далласким критериям (Caforio A.L., et al. 2020). «Острый миокардит» диагностируют при выявлении более 14 лимфоцитов и макрофагов на площади гистологического среза 1мм^2 в сочетании с признаками некроза и дистрофии кардиомиоцитов. Для постановки диагноза «пограничный миокардит» необходимо наличие 14 или более лимфоцитов и макрофагов на площади 1мм^2 биоптата, в сочетании с фиброзом, но при отсутствии некроза и дистрофии кардиомиоцитов (Basso C., et al. 2013).

У животных с ГБ 101.8 без введения ЛП, активность КФК была выше, по сравнению с референсными значениями у интактных крыс в общей популяции. Повышение активности КФК свидетельствует о повреждении метаболически активных тканей и клеток, которые активно «потребляют» АТФ, таких как клетки головного мозга, миоциты, кардиомициты, опухолевые клетки. Разные типы опухолей способны продуцировать КФК-МВ (Chang C.C. et al., 2015; Eidizadeh A. et al., 2019).

По нашим данным у животных с ГБ 101.8, которым вводили Докс-PLGA, повышение активности КФК как общей, так и ее сердечной изоформ было статистически значимо ниже, чем в группе крыс, которым вводили Докс, и у животных с опухолью без введения ЛП. В нашей работе на поздней стадии развития ГБ 101.8 у крыс без введения ЛП обнаружено достоверно высокая активность АСТ в сыворотке крови по сравнению с референсными значениями, что, очевидно, может быть связано как с интенсивным процессом роста и распада опухоли и выходом клеточных ферментов в кровотоки, и в меньшей степени с повреждением кардиомиоцитов и влиянием ЛВ на клетки эритроцитарного ряда (Zucchi R., 2003; Pereverzeva E. et al., 2019). Многие опухоли, в том

числе ЦНС, ассоциированы с патологией сердечно-сосудистой системы (Paterson D.I. et al., 2022). Активность АСТ была статистически значимо ниже в группах животных с ГБ 101.8, которым вводили Докс и Докс-PLGA, однако при введении крысам Докс-PLGA активность АСТ была наименьшей. Считается, что АЛТ преобладает в печени, а АСТ – в миокарде, следовательно, при повреждении миокарда или печени в крови повышается активность одного из этих ферментов (Moussavian, S. N. et al., 1985; Северин Е.С., 2003). 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). Данные изменения у онкологических больных могут быть вызваны как паранеопластическим синдромом, так и токсическими эффектами химиотерапии. В нашем исследовании паранеопластический синдромом выступает как основная причина повышения активности АСТ и коэффициента де Ритиса, так как в группе животных с ГБ 101.8 без введения ЛП данные показатели были максимальными. 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, может быть связана с кардио- и меньшей гепатотоксичностью Докс и Докс-PLGA. Также повышение активности АСТ > АЛТ может быть вызвано дерматомиозитами, которые характерны для паранеопластического синдрома (Giboney P.T., 2005). Наиболее высокие значения коэффициента де Ритиса были в группе животных с ГБ без введения ЛП, что может быть обусловлено эффектами, ассоциированными с ростом опухоли, а наименьшие в группе животных, которым вводили Докс-PLGA, что косвенно отражает менее тяжелое токсическое действие опухоли на организм в связи с ее малыми размерами.

Таким образом, по данным морфологического и биохимического исследования можно предположить меньшую токсичность Докс-PLGA для миокарда и меньшее токсическое воздействие опухолевого роста на организм животных данной группы, чем при введении крысам Докс и контрольной группы животных с опухолью без введения ЛП.

На данный момент времени не существует убедительных доказательств применения ЛВ для снижения кардиотоксичности, связанных с антрациклинами (Докс), а отказ от них является единственной эффективной мерой (Ramshorst M.S. et al., 2018).

Кардиотоксичность, ограничивающая дозу Докс, значительно снижается при использовании его наноформ. Наши данные согласуются с результатами клинических исследований, где эффективность липосомального Докс была равной, а кардиотоксичность меньшей по сравнению с его стандартной формой (Anchordoquy T.J. et al., 2017). Считают, что окислительный стресс, подавление регуляции генов сократительных белков, апоптоз, опосредованный p53, повреждение митохондрий (Wu B.B. et al., 2022), ферроптоз (Qin Y. et al., 2021) вызывает развитие кардиомиопатии, ассоциированной с применением Докс (Chatterjee K. et al.; 2010). Препараты Докс в твердых липидных НЧ снижали его токсичность для тканей сердца (Zhang L. et al., 2019). Токсикологические исследования НЧ Докс показали снижение гематологической, сердечной и тестикулярной токсичности по сравнению со стандартной формой Докс (Pereverzeva E. et al., 2019).

У пациентов, ранее получавших химиотерапию препаратами антрациклинового (Докс) и неантрациклинового ряда, а также пожилых людей повышен риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому наносомальные формы антрациклинов, могут снизить их токсичность, так при их применении реже встречается застойная сердечная недостаточность, нейтро- и тромбоцитопения, миелосупрессия, алоpecia, тошнота и рвота по сравнению со стандартными формами антрациклинов (Rafiyath S.M. et al., 2012). Для снижения пиковых концентраций Докс рекомендована пролонгированная инфузия, которая снижает тяжесть кардиомиопатии, вызванной Докс (Doroshov J.H. et al., 2020). Поэтому Докс в составе НЧ, за счет постепенной биodeградации позволяет также избегать его пиковых концентраций и снижать токсичность.

Частота, повреждения печени, связанная с применением ЛВ, составляет от 21 до 27 случаев на 100 000, причем при применении Докс у больных с опухолью молочной железы, уровень гепатотоксичности составляет 30,4 %, в то время как у пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи, получавших цисплатин и доцетаксел, был 22,2 %. Также показана значительная гепатотоксичность таргетных ЛВ, мишенями которых являются CTLA-4, PD-1 и PD-L1, она была в пределах 5-10%, а низкомолекулярных ингибиторов VEGF и тирозинкиназы – была от 6,6 до 15,5% и 25-35% соответственно (Mudd T.W. et al., 2021).

В нашем исследовании патоморфологических изменений печени у крыс с ГБ 101.8 не выявлено. У крыс, которым вводили Докс и Докс-PLGA гепатоциты периферических отделов долек были в состоянии умеренной мелко- и среднекапельной вакуольной дистрофии, более распространенной в периферических отделах долек. Количество неэпителиальных клеток было увеличено.

Сравнивая активности фермента АЛТ, который в большей степени отражает повреждение клеток печени (Amacher D.E., 1998; Shivakumar P. et al., 2012), мы обнаружили статистически значимое увеличение АЛТ в сыворотке крови крыс с ГБ 101.8, которым вводили Докс, но ее активность была в пределах референсных значений 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. Таким образом, Докс и Докс-PLGA оказывали слабо выраженное токсическое действие на печень животных. Клинические исследования показали индуцированные химиотерапевтическими препаратами Докс и цисплатином, повреждения печени в результате окислительного стресса. Повышалась экспрессия цитохрома P450, что приводило к снижению жизнеспособности клеток, за счет снижения глутатиона и более высокой продукции АФК. В результате активировалось перекисное окисление липидов клеточных мембран, повышалась экспрессия проапоптотических генов (*Bax*), и нарушался энергетический метаболизм митохондрий. Клинические проявления повреждения печени включали высокие уровни АЛТ и АСТ в сыворотке крови (Lu Y. et al., 2006; Prasanna P.L. et al., 2020). PLGA НЧ при внутривенном введении накапливаются преимущественно в печени и селезенке, захват и поглощение НЧ макрофагами происходит после их опсонизации Fc-фрагментами иммуноглобулинов. Модификация поверхности частиц может снижать захват НЧ макрофагами в печени и селезенке. Разрушение НЧ в резидентных макрофагах печени и селезенке снижает эффективность их целенаправленной доставки к клеткам опухоли (Arami H. et al., 2015; Inturi S. et al., 2015). Докс у онкологических пациентов может усиливать радиационно-индуцированную токсичность в отношении миокарда, слизистых оболочек, кожи, печени и легких. Докс может повышать уровни АЛТ и АСТ в сыворотке крови пациентов. Период полураспада Докс при его распределении по органам и тканям варьирует и составляет около 5 минут, в то время как конечный период полураспада составляет около 48 часов.

Исследование влияния Докс и его липосомальной формы на индукцию апоптоза/некроза, геномных повреждений, окислительного стресса и патологий печени показали, что максимальная терапевтическая доза липосомального Докс (0,1 мг/кг/масса тела) может индуцировать клеточное старение, достоверно увеличивая уровень генотоксического повреждения и окислительного стресса по сравнению с аналогичной дозой Докс (Shokrzadeh M. et al., 2021).

В исследованных нами тканях почек интактных животных патологических изменений не было выявлено. В строме коркового вещества почки у 3-х крыс были небольшие скопления лимфоцитов и гистиоцитов. При ультраструктурном исследовании эпителиоциты проксимальных и дистальных канальцев и собирательных трубочек имели нормальное строение. 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. 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 сутки. Нефротоксический эффект Докс был статистически значимо более выраженным, чем Докс-PLGA как на 8-е, так и на 21-е сутки.

Почки играют важную роль в клиренсе НЧ, их выведение зависит от размера, формы, модификации поверхности, заряда и может значительно различаться у разных типов НЧ. Отдельные исследования показали, как усиление накопления НЧ покрытых ПЭГ в почках (Liu H. et al., 2014; Salimi M. et al., 2018; Williams R.M. et al., 2018), так и предотвращение накопления (Kojima C. et al., 2010; Kojima C. et al., 2011) и отсутствие влияния (Chatterjee K. et al., 2010; Xue W. et al., 2018). Ряд исследований указывает, что покрытие ПЭГ усиливает накопление НЧ в (Liu H. et al., 2014; Salimi M. et al., 2018; Williams R.M. et al., 2018) и их выведение с мочой (Choi H.S. et al., 2009; Huang X. et al., 2011; Liu J. et al., 2013). Предположительно, данный эффект обусловлен тем, что такие НЧ меньше захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы, что увеличивает время их циркуляции и позволяет в большей степени накапливаться в почках.

Размер и поверхностные заряды НЧ являются важными параметрами, определяющими их фармакокинетику и биораспределение. Частицы размерами менее 6

нм подвергаются быстрому почечному клиренсу, а размерами более 200 нм метаболизируются в печени и селезенке, период полувыведения НЧ и макромолекул из крови и организма увеличивается с ростом их диаметра (Jiang W. et al., 2015; Cabral H. et al., 2011).

Некоторые ксенобиотики метаболизируются в гепатоцитах, другие – в эпителии почечных канальцев, некоторые в обеих структурах, а также и в других органах. Возможен ретрансляционный метаболизм, когда метаболит, который был конъюгирован в печени, попадает в клетки почечных канальцев, где конъюгат, разрушается, а свободный ксенобиотик высвобождается в клетки канальца (Dalefield R., 2017). Как и в печени, синтез токсического метаболита может происходить и в почках из нетоксичного ксенобиотика. Докс имеет выраженный мочегонный эффект, он метаболизируется в печени до активных и неактивных форм, большая часть Докс и его метаболитов выводится с желчью. НЧ Докс (липосомы) метаболизируются в печени, при этом значительные уровни основного метаболита доксорубицинола в плазме крови, не наблюдаются при применении НЧ Докс, вероятно, из-за медленного распределения свободного Докс в печени, так период полувыведения липосом в плазме составляет 55 часов (Doroshov J.H. et al., 2020).

Нефропатия, опосредованная Докс, характеризуется клеточными нарушениями в клубочках почек и канальцах. Нефротоксичность Докс менее изучена, чем кардиотоксичность. Механизмы токсичности Докс связаны с образованием АФК, перекисным окислением липидов и снижением активности антиоксидантных ферментов, развитием воспаления с продукцией широкого спектра цитокинов и других цитотоксических факторов. Докс также может вызывать выведение белка с мочой, нарушая гломерулярный фильтр, разрушая структуры нефрона. Нефропатия, индуцированная Докс является классической моделью почечной недостаточности у грызунов (Lee V.W. et al., 2011). Однако она в меньшей степени выражена у онкологических больных (Grant M.K.O. et al., 2019). Считается, что превращение Докс в семихинон играет существенную роль в нефротоксическом действии. Семихинон не стабилен в аэробных условиях и, следовательно, вступает в реакцию с молекулярным кислородом с образованием супероксидных анионных радикалов. По мере увеличения количества первичных свободных радикалов локально инфильтрирующие нейтрофилы и

активные мезенхимальные клетки клубочков генерируют больше свободных радикалов, которые повреждают ткани почек. Докс оказывает прямое токсическое повреждение на подоциты и эндотелиальные клетки клубочков, и вызывает интерстициальное воспаление канальцев и фиброз (Lautner R.Q. et al., 2013).

Некоторые исследования указывают на то, что после травмы головного мозга высвобождается мозговой натрийуретический пептид (BNP), который затем попадает в системный кровоток через нарушенный ГЭБ. BNP действует на собирательные мочевые протоки, подавляя реабсорбцию натрия, а также уменьшая высвобождение ренина (Tenny S. et al., 2022). Возможно, этот же механизм задействован и при травме, полученной при моделировании ГБ 101.8 и также повреждениях, вызываемых ростом опухолей ЦНС у пациентов. Этот механизм, повышения BNP в крови, возможно, связан с усилением отека тканей, в том числе, головного мозга (Щекочихин Д.Ю. с соавт., 2017).

НЧ размером от 6 до 100 нм могут проходить через фенестры эндотелия, но не могут пройти между эндотелиальными клетками и базальной мембраной клубочка, что приводит к накоплению НЧ в почках. Частицы крупнее 100 нм не могут ни фильтроваться, ни задерживаться в почках (Choi C.H.J. et al., 2011). Naumenko V. et al. (2019) установили при оценке биораспределения НЧ кубической формы размерами 140 нм их транзитное накопление в почках и экскрецию с мочой. Также подобное необычное накопление органических НЧ в почках было показано ранее для органических НЧ с размером около 400 нм (Williams R.M. et al., 2018). Авторы считают, что, возможно, данный эффект реализуется за счет транцитоза НЧ через эндотелиальные клетки капилляров почечных канальцев, и связан с резким падением кровяного давления и скорости кровотока в капиллярах. В последующем НЧ высвобождаются в тубулоинтерстиций и захватываются эпителиальными клетками канальцев. Транцитоз НЧ через эндотелий (Tietjen G.T. et al., 2017; Voigt J., 2014; Kreyling W.G. et al., 2014) и эпителий (Kreyling W.G. et al., 2014; Braakhuis H.M. et al., 2015) детально описан *in vitro* и *in vivo*, и, в частности, перенос крупных НЧ золота (200 нм) через гемато-альвеолярный барьер был сопоставим с таковым для мелких частиц (5 нм). Ксенобиотики могут попадать в почечные канальцы с клубочковым фильтратом, путем пассивной диффузии через клетки канальцев или с помощью активных механизмов канальцевого транспорта. В отличие от клубочковой фильтрации, активные канальцевые пути экскреции или реабсорбции являются

насыщаемыми, и может возникать конкуренция за эти пути, что приводит к изменению скорости экскреции или реабсорбции. Некоторые ксенобиотики могут активно транспортироваться в клетки канальцев, но у них отсутствует столь же эффективный транспортный механизм с базальной стороны клетки, в результате чего ксенобиотик накапливается до токсичных уровней в клетках канальцев. Меньшая нефротоксичность Докс-PLGA может быть связана с гистогематическим барьером почки, который ограничивает проникновение НЧ. Преимущественное накопление в тканях опухоли и постепенная биodeградация Докс-PLGA НЧ, которая способствует снижению пиковых концентраций Докс в плазме крови, также способствуют снижению нефротоксичности.

Таким образом, сравнительное исследование Докс и Докс-PLGA позволило установить, что Докс-PLGA оказывает более выраженный терапевтический и менее выраженный кардио- и нефротоксический эффекты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования по оценке противоопухолевого эффекта Докс и Докс-PLGA на модели глиобластомы 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 глиобластоме 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 слабо выражено и характеризуется 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 находилась в пределах референсных значений.

Терапевтические дозы Докс и его PLGA-наноформы 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-наноформы, 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-наноформы на модели глиобластомы следует учитывать при разработке новых подходов к лечению ГБ у человека.

ВЫВОДЫ

1. Курсовое введение крысам с глиобластомой 101.8 терапевтических доз доксорубицина (Докс) и доксорубицина 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГА – Аргинилглициласпарагиновая кислота

АДФ – Аденозиндифосфат

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

ГБ – глиобластома

ГБ 101.8 – экспериментальная модель глиобластомы штамм 101.8 крысы

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМБА – 7,12-диметил-5,6-бензо[а]зантрацен

Докс – доксорубицин

Докс-PLGA – доксорубицин в составе наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот

ИЛ-1 β – интерлейкин 1 β

ИЛ-6 – интерлейкин-6

ККО – коэффициент клеточного обновления

КФК – креатинфосфокиназа

КФК-МВ – креатинфосфокиназа сердечная изоформа

ЛВ – лекарственное вещество

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛП – лекарственный препарат

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

м НЗК36me3 – Histone гистон

HC gp-39 – cartilage glycoprotein 39 – ген хрящевого гликопротеина

НЧ – наночастицы

ПАВ – поверхностно активное вещество

ПБЦА – полибутилцианакрилат

ПЛА – Полимер молочной кислоты

PLGA – сополимер молочной и гликолевой кислот

PLGA-НЧ – наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭИ – полиэтиленимин

ПЭМ – Просвечивающая электронная микроскопия
 P188 – плуроник P 188
 P-gr – P-glycoprotein –Р-гликопротеин
 РУДН – Российский университет дружбы народов
 СК – стволовые клетки
 СПЖ – средняя продолжительность жизни
 СПЖ – средняя продолжительность жизни
 Т/С – полуколичественный критерий оценки терапевтической активности
 Т/С – Therapy Terapy/control– терапия/контроль
 ТРО – торможение роста опухоли
 УПЖ – увеличение продолжительности жизни
 УПЖ – увеличение продолжительности жизни
 ФДТ – Фотодинамическая терапия
 ФНО- α – Фактор некроза опухоли-альфа
 ХТ – химиотерапия
 ШИК – Pas-Реакция (Periodic Acid - Schiff (PAS) reaction) – Pas-Реакция (периодическая кислота - Schiff (PAS))
 8-OHdG – 8-Oxo-2'-deoxyguanosine – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин
 ACE-1 – Angiotensin-Converting Enzyme – ангиотензинпревращающий фермент-1
 Ang-1 – Angiopoietin 1– ангиопоэтины-1
 АРОЕ – Apolipoprotein E– аполипопротеин E
 AQP4 – Aquaporin 4 – аквапорин 4
 AQP9 – Aquaporin 9 – аквапорин-9
 ATRX – Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked – Альфа-талассемия/синдром умственной отсталости, сцепленный с X-хромосомой
 Bак – проапоптотический белок Bcl-2
 Bак – Bcl-2-associated X protein \rightarrow Bcl-2-ассоциированный X-белок
 Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 – В-клеточная лимфома-2
 Bcl-xL – B-cell lymphoma-extra large \rightarrow В-клеточная лимфома очень большая, антиапоптотический белок
 BCRP– Breast Cancer Resistance Protein – белок устойчивости опухоли молочной железы, участник множественной лекарственной устойчивости

BDNF – brain-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор мозга

Bim – Bcl-2 Interacting Mediator of cell death – Bcl-2 взаимодействующий медиатор клеточной гибели, регулятор апоптоза

BMP – Bone morphogenetic protein – костный морфогенетический белок

BNP – Brain natriuretic peptide – мозговой натрийуретический пептид

BRAF – mouse sarcoma viral oncogene v-Raf B homologue – гомолог вирусного онкогена мышинной саркомы v-Raf B, протоонкоген

BRCA – Breast cancer – ген, кодирующий белок опухоли молочной железы

C/EBP β – CCAAT/enhancer binding protein β – CCAAT/энхансер-связывающий белок β

CCL2 – The chemokine (C-C motif) ligand 2 – лиганд 2 хемокина (C-C мотив)

CCL5 – Chemokine (C-C motif) ligand 5 – лиганд 5 хемокина (C-C мотив)

CDK4 – cyclin dependent kinase 4 – циклин-зависимая киназа 4

CDKN2A/B – Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A – ингибитор циклин-зависимой киназы 2A

c-Myc – cellular Myc – клеточный Myc, протоонкоген

CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated (Cas) endonuclease – сгруппированные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы / CRISPR-ассоциированная (Cas) эндонуклеаза

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 – цитотоксический белок, ассоциированный с Т-лимфоцитами 4

CYP450 – цитохром P450

DAB – 3, 3 -diaminobenzidine – 3, 3-диаминобензидин

DPDPE – [D-пеницилламин₂, D-пеницилламин₅]-энкефалин

Dpi – Dots Per Inch – Точек на дюйм

EGFR – epidermal growth factor receptor – рецептор эпидермального фактора роста, рецепторная тирозинкиназа

EMA – The European Medicines Agency – Европейское агентство по лекарствам

EPR – The enhanced permeability and retention effect – эффект повышенной проницаемости и удержания

FAS – ген, кодирующий Fas-рецептор, участвует в программируемой гибели клеток

FDA – Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

FGF – Fibroblast growth factors – фактор роста фибробластов
 FGFR – Fibroblast growth factor receptor – рецептор фактора роста фибробластов
 FOXO1 – Forkhead box protein O1 – Белок коробки вилки O1
 GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор глиального происхождения
 GFAP – Glial fibrillary acidic protein – Глиальный фибриллярный кислый белок
 GLUT-1 – Glucose transporter 1 – транспортер глюкозы 1
 HIF1 – Hypoxia-inducible factor 1-alpha – фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа, вовлечен в этиологию опухолей
 HIS72TYR – CYBA: cytochrome b-245 alpha chain – альфа-цепь цитохрома b-245
 HO-1 – heme oxygenase-1 – гемоксигеназа-1
 ICAM-1 – Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 – Молекула межклеточной адгезии 1
 IDH – Isocitrat Dehydrogenase – изоцитратдегидрогеназа
 IFN γ – Interferon gamma – интерферон гамма
 Igf 1/2 – Insulin-like growth factor – инсулиноподобный фактор роста 1, гормон
 I κ B α – nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha – ядерный фактор энхансера гена полипептида каппа-легкого в ингибиторе В-клеток, альфа
 I κ B α – Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha – Ингибитор субъединицы альфа киназы каппа-В ядерного фактора
 IRP – Iron-responsive element-binding protein – железочувствительный элемент-связывающий белок
 IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry – Международный союз чистой и прикладной химии
 JAK – Janus kinase – Янус киназа
 Ki67 – маркер пролиферации клеток
 LIF – Leukemia inhibitory factor – лейкемия ингибирующий фактор
 LOH – loss of heterozygosity Потеря гетерозиготности
 MDM2 – Mouse double minute 2 homolog
 MDR – Multidrug resistance – белок множественной лекарственной устойчивости
 MDRP – multidrug-resistant protein – белок множественной лекарственной устойчивости
 MET – Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase – Протоонкоген, рецепторная тирозинкиназа

Me–медиана

MGMT – O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase – Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза

MMRd-MMR – DNA mismatch repair deficiency – дефицит репарации несоответствия

MRP – Multidrug resistance-related protein – Белок, связанный с множественной лекарственной устойчивостью

MSH – Mouse double minute 2 homolog – Белок репарации несоответствия ДНК

MSI-H – high number of mutations (changes) within microsatellites instability – высокая микросателлитная нестабильность

Мус – Myelocytomatosis–миелоцитоматоз

NAD(P)H – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – НАД(Ф)Н
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

N-CAM – Neural cell adhesion molecule – Молекула адгезии нервных клеток

NCCN – National Comprehensive Cancer Network – Национальная комплексная онкологическая сеть

NF1 – Neurofibromatosis type 1 – Нейрофиброматоз 1 типа

NF-κB – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells– Усилитель ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных В-клеток

Nrf2 – The nuclear factor erythroid 2–related factor 2 – Ядерный фактор, связанный с эритроидом 2, фактор 2

NTRK – Neurotrophic tyrosine receptor kinase – нейротрофическая рецепторная тирозинкиназа

OsO₄ – Osmium tetroxide – окись осмия (IV)

p21 – a potent cyclin-dependent kinase inhibitor – мощный ингибитор циклинзависимой киназы

p53 – Tumor protein P53 – Белок опухоли P53

p65 – Transcription factor – Фактор транскрипции

PD-1 – Programmed cell death 1– белок запрограммированной гибели клеток 1

PDGFRA – platelet-derived growth factor receptor A – рецептор тромбоцитарного фактора роста A

PD-L1 – Programmed death-ligand 1– лиганд запрограммированной гибели 1

pH_e – extracellular pH – внеклеточный pH

pH_i –intracellular pH – внутриклеточный pH

PIK3CA – Phosphatidylinositol 3-kinase – Фосфатидилинозитол-3-киназа
 PTEN – Phosphatase and tensin homolog – Гомолог фосфатазы и тензина
 Puma – The p53 upregulated modulator of apoptosis, P53-регулируемый модулятор апоптоза, проапоптотический белок
 RAD51 – DNA repair protein RAD51 homolog 1 – Гомолог 1 белка репарации ДНК
 Ras – Rat sarcoma virus – Вирус крысиной саркомы
 Rb1 – The retinoblastoma gene – Ген ретинобластомы
 ROS1 – Proto-oncogene tyrosine-protein kinase – Протоонкогенная тирозин-протеинкиназа
 S100 – calcium-binding protein – белок связывающий кальций
 Shh –sonic hedgehog – Сверхзвуковой ежик
 Src – non-receptor tyrosine kinase нерецепторная тирозинкиназа
 STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3 – Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3
 TAZ – WW domain-containing transcription regulator protein 1– WW содержащий -домен транскрипционного регуляторного белка 1, транскрипционный фактор
 TERT – TElomerase Reverse Transcriptase –Теломераза обратная транскриптаза
 Торо II – Топоизомераза 2
 TP53 – Tumor protein 53 опухолевый белок P53
 TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling – мечение концевой части дезоксирибонуклеотидилтрансферазы dUTP, метка 3'-гидроксильных концов в двуцепочечных разрывах ДНК
 V – volume– объем
 VEGF – Vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов
 Wnt3A – Proto-oncogene protein – Протоонкогенный белок
 YAP – yes-associated protein – yes ассоциированный белок 1, ко-регулятор транскрипции
 ZO-1 – zonula occluden-1– зонала окклюдин -1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абросимов А.Ю.; Двинских Н.Ю.; Лушников Е.Ф. Патоморфоз опухолей человека. Специальное издательство медицинских книг. 2021. ISBN 978-5-91894-092-1 224 с
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
3. Автандилов Г.Г., Яблучанский Н.И., Губенко В.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса. М.: Медицина, 1981. 192 с.
4. Авцын А.П. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Биологическая характеристика перевиваемой глиомы крысы штамма 101.8 / Сборник научных трудов. «Актуальные вопросы современной гистопатологии». М., 1988. С. 45–46.
5. Авцын А.П., Кондакова Л.И., Халанский А.С. Биологические основы нейроонкологии // Вестник РАМН, -1993.-№7. – С. 51-54.
6. Бабак О.Я. Клиническое значение и диагностическая тактика при повышении уровня трансаминаз в сыворотке крови при отсутствии клинических проявлений // Медицинский журнал "Искусство Лечения. Мистецтво лікування". — 2006. — Вып. № 8 (34).
7. Бажанов С.П. Комплексное лечение пациентов со злокачественными глиомами головного мозга супратенториальной локализации / С.П. Бажанов // Саратовский науч.-мед. журн. – 2010. – Т. 6, № 1. – С. 189-194.
8. Базиков И. А., Бейер Э. В., Лукинова В. В., Мальцев А. Н. Сравнительная оценка острой токсичности доксорубицина и его ниосомальной формы // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2015. №4 (38). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnaya-otsenka-ostroy-toksichnosti-doksorubitsina-i-ego-niosomalnoy-formy>
9. Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э. Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц. Фармакокинетика и Фармакодинамика. 2012;(2):3-9.
10. Балыкова Л.А., Инчина В.И., Тарасова Т.В., Мосина Л.М., с соавт. Эффективность липосомального доксорубицина гидрохлорида в комбинации с циклофосфаном в лечении рака молочной железы в эксперименте. Research'n Practical Medicine Journal. 2021;8(4):23-32. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2021-8-4-2>
11. Брюховецкий И.С., Дюйзен И.В., Шевченко В.Е., Хотимченко Ю.С. Стволовые клетки глиобластомы индуцируют миграцию нормальных стволовых клеток // ТМЖ. 2016. №2 (64). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/stvolovye-kletki-glioblastomy-indutsiryuyut-migratsiyu-normalnyh-stvolovyh-kletok>
12. Гарифулин О.М., Шостак К.А., Дмитриенко В.В. с соавт. Повышенная экспрессия генов SOX-2 и NS gp-39 в глиомах. // Биополимеры и клетка (Укр). 2002.- Т.18.- № 4.- С.324-328
13. Герасимова Г.К., Смирнова З.С., Халанский А.С. Сравнительное изучение действия новых противоопухолевых препаратов на перевиваемую глиобластому крыс. //Тез. I съезда онкологов стран СНГ. Москва 3-5 дек. 1996.-Ч.1.-С.152-153.

14. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Рыбалкина Е.Ю., Павлова Е.Н., Онищенко Г.Е. влияние рифампицина и его нкапсулированной формы на функциональную активность белка множественной лекарственной устойчивости Pgp в миелоидных клетках человека. Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. 2018. № 2. С. 28-39.
15. Жданов, В.С. Влияние липоидоза коллагеновых волокон на развитие атеросклеротических бляшек при ишемической болезни сердца / В.С. Жданов, И.П. Дробкова, В.Г. Цыпленкова, С.П. Веселова // Атеросклероз и дислипидемии. – 2017. - №1(26). – С.60-67
16. Зрелов А.А., Мацко М.В., Мацко Д.Е., Улитин А.Ю., Бакшеева А.О., Скляр С.С., Имянитов Е.Н., Тастанбеков М.М. Проллиферативная активность (ki-67) и уровень экспрессии гена сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в гемистоцитарных астроцитомах. Трансляционная медицина. 2018; 5 (1): 44–52.
17. Инчина В.И., Избастыева М.Д. Оценка эффективности различных режимов и доз тамоксифена в комбинации с доксорубицином гидрохлоридом при экспериментальной противоопухолевой терапии // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 4.
18. Казанцева И.А., Гаганов Л.Е. Морфологические показатели клеточного обновления в карциномах желудка и их прогностическое значение. Архив патологии. 2014;76(4):38.
19. Какорин С.В., Былова Н.А. Клинический случай высокого уровня креатинфосфокиназы. Архивъ внутренней медицины. N 2(22) 2015 С. 62-64. УДК 616.15-07:616.15
20. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. - илл. - 236 с. ISBN 978-5-85502-231-5
21. Квитницкий-Рыжов Ю. Н. Современное учение об отеке и набухании головного мозга. — Здоров'я. — Київ, 1988.
22. Кирпичников М.П., Ермолюк Я.С., Мойсенович М.М. с соавт. Противоопухолевое действие конъюгата рекомбинантного эпидермального фактора роста и Асубъединицы рицина. //Российский химический журнал. – 1998.- Т.42, №5.- С. 97- 100.
23. Коган Е.А., Ворожцов Г.Н. Смирнова З.С. Эффективность фотодинамической терапии с фотосенсом глиобластомы 101/8 крыс. //Рос. биотерапевт. журн., - 2009. -N 4.- С.73-78
24. Колотов К.А. Клинико-морфологическая характеристика церебральных глиом в прогностическом аспекте / К.А. Колотов // Материалы докладов IX конгресса Международ. ассоциации морфологов. - Морфология, 2008. - Т. 133, № 2. - С. 65.
25. Краевский Н. А. Новые морфологические методы в онкологии: (на примере опухолей из переходного эпителия) / Райхлин Неух Танфелевич ; под ред. Н. А. Краевского. - Москва: Медицина, 1977. - 344 с.

26. Кройтер Й., Гелперина С., Максименко О., Халанский А., Pat. US 2009/0263491 A1. IPC: A61K 9/14, C08B 3/06. Полилактидные наночастицы /, LTS Lohmann therapie-systeme AG(DE). N 2008140367/15; Заявл. 13.03.2007; Опубл. 22.10.2009
27. Круглов А. Д. Дудина Г. А., Калитин Н. Н., Карамышева А. Ф. МКНЦ им. А.С. Логинова, нмицо им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия; Изменения экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов VEGF и их рецепторов VEGFR при миелодиспластическом синдроме Мат. XXVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2019. – С. 19.
28. Кувачева Н.В., Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Малиновская Н.А., с соавт. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013;113(4):80-85.
29. Кузнецова Г.Д., Подолец А., Халанский А.С. Тепловые реакции мозга животных на развитие интракраниальной опухоли. //Тепловая аппаратура и практика ее применения ТЕМП -88 Л.- 1988.-С. 141-145.
30. Лавникова Г.А. (1976) Некоторые закономерности лучевого патоморфоза опухолей человека и их практическое использование. Вестн. АМН СССР, 6: 13–19.
31. Лавникова Г.А. (1979) Гистологический метод количественной оценки терапевтического повреждения опухоли. Москва.: Методические рекомендации, 13 с.
32. Лавникова Г.А., Гош Т.Е., Талалаева А.В. (1978) Гистологический метод количественной оценки степени лучевого повреждения опухоли. Мед. радиол., 3: 6–9.
33. Левитман М.Х., Любимова Н.В., Плотникова Е.Д. с соавт. Некоторые количественные параметры сосудистой сети перевиваемых опухолей головного мозга в эксперименте на крысах. // БЭБиМ. - 1990.- Т.60.- №12.- С.638-641.
34. Лисяный Н.И., Гнедкова, И.А.Бирска Б.И. Влияние полигексаметилгуанидина, ингибирующего активность L-орнитиндекарбоксилазы, на развитие экспериментальной глиомы мозга и иммуногенез. //Эксп и клин фармакотер. - 1986. - Вып. 16.- С. 45-54.
35. Логинов В.М., Воробьев Ю.В., Халанский А.С. Содержание лактата в глиальных опухолях и мозговой ткани в эксперименте при искусственной кратковременной гипергликемии. //Вопр. нейрохир. - 1985.- № 2.- С.31-36.
36. Лушников Е. Ф, Абросимов А. Ю. Гибель клетки (апоптоз): [Монография] / М. Медицина, 2001. - 189, [1] с.: ил., табл.; 22 см.; ISBN 5-225-04424-7
37. Лушников Е.Ф. (1976) Терапевтический патоморфоз опухолей человека в практическом и теоретическом аспектах. Вестник АМН СССР, 6: 7–12.
38. Лушников Е.Ф. (1977) Лучевой патоморфоз опухолей человека. М.: Медицина, 328с.
39. Макаров В.Г., Макарова М.Н. Коллектив авторов: Абрашова Т.В., Гушин Я.А., Ковалева М.А., Рыбакова А.В., Селезнева А.И., Соколова А.П., Ходько С.В. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: Изд-во «ЛЕМА», 2013.- 116 с. ISBN 978-5-98709-619-2

40. Макарова Н.П., Курило Л.Ф., Халанский А.С., Гельперина С.Э, Шилейко Л.В. Влияния наносомальной лекарственной формы доксорубина на репродуктивную систему самцов крыс // тез конф «Молодые ученые в медицине», 26-27 апреля 2005г, г. Казань, с.203.
41. Меркулов Г. А. Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
42. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств - 2012 Часть вторая. — М.: Гриф и К, 2012. 640-654
43. Моргун А. В., Кувачева Н. В., Комлева Ю. К., с соавт. Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: современное состояние проблемы и перспективы // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2012. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/modeli-gematoentsefalicheskogo-bariera-in-vitro-sovremennoe-sostoyanie-problemy-i-perspektivy>
44. Муравьев, А.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови) / А.В. Муравьев, С.В. Чепоров // Ярославль: Изд-во ЯГПУ, 2009. – 178 С.
45. Мхитаров В.А. Морфологический и морфометрический анализ биологических объектов // Молекулярно-клеточные механизмы патогенного и иммуногенного действия *Aeromonas spp.* Российско-китайский семинар. М., 2007. С. 84-91.
46. Назаретян А.Ш., Малиновская Е.М., Филев А.Д., Ершова Е.С., Вейко Н.Н., Писарев В.М., с соавт. Влияния окисленной внеклеточной ДНК на повреждение ДНК и активацию транскрипции генов, регулирующих репарацию ДНК и апоптоз в клетках линии астроцитомы человека. Медицинская генетика. 2020;19(6):96-99.
47. Олейник Г.М., Хмельницкий Г.В. Изучение противоопухолевой активности хлоридена при злокачественных опухолях головного мозга. / Нейрохирургия. Республиканский межведомственный сборник. - 1992.- Вып. 25.- С. 48-50.
48. Олсуфьева Е. Н. Синтез и противоопухолевая активность новых аналогов антрациклиновых антибиотиков, модифицированных по агликону //Биоорганическая химия. – 1990. – Т. 16. – №. 11
49. Олсуфьева Е. Н. Синтез и противоопухолевая активность новых аналогов антрациклиновых антибиотиков, модифицированных по сахарному остатку //Биоорганическая химия. – 1992. – Т. 18. – №. 2
50. Пономарева А.А., Сыркашев В.А. Значение факторов прогноза при проведении термохимиолучевой терапии глиобластом головного мозга. Сибирский онкологический журнал. 2018; 17 (5): 27–36. – doi: 10.21294/1814-4861-2018-17-5-27-36.
51. Радулеску Г.Г. Темодал в лечении метастатической меланомы // Онкология. 2003. № 4. С. 11–15
52. Розуменко В.Д., Сутковой Д.А., Троян А.И. Состояние свободнорадикальных процессов и системы антиоксидантной защиты организма при глиомах головного мозга в клинике и эксперименте. // Укр. нейрохірург. журн.- 2008.- №2.- С. 38–41.

53. Розуменко В.Д., Сутковой Д.А., Троян А.И. Состояние свободнорадикальных процессов и системы антиоксидантной защиты организма при глиомах головного мозга в клинике и эксперименте. // Укр. нейрохірург. журн.- 2008.- №2.- С. 38–41.
54. Ромоданов А.П., Верхоглядова Т.П., Аннин Е.А. Влияние реумидина, проксифена и проспидина на рост перививной опухоли головного мозга у крыс// Эксп. онкология. - 1981.- №5.- С.71-73
55. Рыжова М.В., Галстян С.А., Телышева Е.Н. Значение оценки метилирования ДНК в морфологической диагностике опухолей ЦНС. Архив патологии. 2022;84(3):65-75. <https://doi.org/10.17116/patol20228403165>
56. Рябова А.И., Новиков В.А., Грибова О.В., Старцева Ж.А., с соавт. Обеспечение внешнего контроля качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы в уральском федеральном округе (Референс) в 2015 г. Вестник уральской медицинской академической науки. 2016, №4, с. 124–130, DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-124-130
57. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Обеспечение внешнего контроля качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы в уральском федеральном округе (Референс) в 2015 г. Вестник уральской медицинской академической науки. 2016, №4, с. 124–130, DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-124-130
58. Свирновский А.И., Пасюков В.В. Молекулярные основы феномена химио- и радиорезистентности при опухолевых процессах. // Журнал «Медицинские новости» 2007. №11, С. 7-19.
59. Северин Е.С. Биохимия / Под ред. — 2003. — С. 469. — 779 с. — ISBN 5-9231-0254-4.
60. Семенова И. М., Ключникова А.И., Лисяный Н.И. с соавт. Особенности лечебного патоморфоза в ткани глиом головного мозга после лечения галавитом.// «Современные принципы лечения нейроонкологических заболеваний. Перспективы развития функциональной нейрохирургии». Судак, АР Крым. - 2011. - С.45
61. Смирнова З.С., Родионова Ю.В., Халанский А.С. с соавт. Зависимость противоопухолевого действия гормоноцитостатика кортифен от экспрессии рецепторов глюкокортикоидов в клетках опухолей мозга крыс. // БЭБиМ.- 1999.- №3.- С. 331-333.
62. Степаненко А.А., Андреева С.В., Корец К.В., Микитенко Д.А., Гулеюк Н.Л., Баклаушев В.П., Чехонин В.П. Хромосомная нестабильность и генетическая гетерогенность как универсальный механизм терапевтической резистентности опухолевых клеток. В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы международного конгресса. 2019. С. 247-248.
63. Стрункин Д.Н., Конончук В.В., Гуляева Л.Ф., Богачев С.С., Проскурина А.С. Современные аспекты систематики, диагностики и лечения рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2022;18(1):25-39. <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2022-18-1-25-39>

64. Сурья Н., Бхаттачарья С. PLGA – перспективный полимер для доставки лекарственных средств. Фармация и фармакология. 2021;9(5):334-345. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-334-345
65. Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Коржевская В.Ф. Иммуногистохимическое выявление астроцитов головного мозга при черепно-мозговой травме. Судебно-медицинская экспертиза. 2010. Т. 53. № 1. С. 14-16
66. Терновой С.К., Араблинский А.В., Евзиков Г.Ю., Осиповская А.С. Компьютерная и магнитно-резонансная томография в оценке радикальности хирургического лечения опухолей головного мозга. медицинская визуализация. №6 2006. с 84.
67. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фрешни ; пер. 5-го англ. изд. — м.: бином. Лаборатория знаний, 2010. — 691 с.: ил., [24] с. цв. вкл. ISBN 978-5-94774-596-2.
68. Халанский А.С. с соавт. Морфологическая оценка противоопухолевого эффекта наносомальной формы доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы у крыс // Биофармацевтический журнал. - 2011. –Т.3. - № 2. – С.912-918.
69. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. Биологическая характеристика // Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. № 4. С. 63-69.
70. Халанский А.С., Кондакова Л.И., Гельперина С.Э. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. II. Использование в качестве модели для экспериментальной терапии опухолей мозга. // Клиническая и экспериментальная морфология, 2014, 1, 50-59.
71. Халанский А.С., Яблоновская Л.Я. Цитофотометрическое определение содержания ДНК в клетках экспериментальных опухолей мозга. I. Перевиваемые штаммы опухолей мозга лабораторных животных. // Цитология. - 1973.- Т.15.- No7.- С. 912-918
72. Чаулин А.М., Дупляков Д.В. Аритмогенные эффекты доксорубина. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020;9(3):69-80. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2020-9-3-69-80>
73. Шарафутдинова Л.А. Токсическое влияние рутильной формы диоксида титана на морфологические характеристики органов иммунной системы. Токсикологический вестник. 2022;30(2):115-121. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2021-30-2-115-121>
74. Шекунова ЕВ, Ковалева МА, Макарова МН, Макаров ВГ. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2020;10(1):19–28. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28>
75. Щекочихин Д.Ю., Козловская Н.Л., Копылов Ф.Ю., Сыркин А.Л., Шилов Е.М. Гипонатриемия: клинический подход. Терапевтический архив. 2017;89(8):134140. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898134-140>
76. Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П., Гурина О.И. с соавт. Противоопухолевые эффекты моноклональных антител к внеклеточному фрагменту коннексина_43 при индуцированной низкодифференцированной глиоме //Клеточн. Технол.в биол.и мед. - 2012.-№ 1.- С.52-57

77. Юсубалиева Г.М., Левинский А.Б., Зоркина Я.А., Баклаушев В.П., с соавт. Проницаемость ГЭБ у здоровых крыс и при экспериментальной глиоме С6 после фракционной радиотерапии головного мозга. Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. 2015;79(3):15-26. <https://doi.org/10.17116/neiro201579315-26>
78. Ющук Н. Д.; Рослый И. М., Белова Е. Г., Бургасова О. А., Попова Т. И. Функциональное состояние печени при инфекционном мононуклеозе у взрослых. Лечащий Врач (журнал). 2010.
79. Яблоновская Л.Я., Спрышкова Н.А. Морфологическая и биологическая характеристика экспериментальных опухолей мозжечка крыс // Архив патологии. 1967. Т. 33, № 2. С. 50-53.
80. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002;200(6):629-638. doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x
81. Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 Sep 1;315(3):C343-C356. doi:10.1152/ajpcell.00095.2018.
82. Abedi AA, Grunnet K, Christensen IJ, Michaelsen SR, et al. A Prognostic Model for Glioblastoma Patients Treated with Standard Therapy Based on a Prospective Cohort of Consecutive Non-Selected Patients from a Single Institution. *Front Oncol.* 2021 Feb 25; 11:597587. doi: 10.3389/fonc.2021.597587
83. Abraham, D. Retrometabolism-based drug design and targeting (2010). "3". In Abraham, D. (ed.). *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development; Vol. 2: Discovering Lead Molecules.* Wiley & Sons; New York.
84. Abulateefeh SR. Long-acting injectable PLGA/PLA depots for leuprolide acetate: successful translation from bench to clinic. *Drug Deliv Transl Res.* 2023 Feb;13(2):520-530. doi: 10.1007/s13346-022-01228-0.
85. Agarwal A, Mackey MA, El-Sayed MA, Bellamkonda RV. Remote triggered release of doxorubicin in tumors by synergistic application of thermosensitive liposomes and gold nanorods. *ACS Nano* (2011) 5:4919–26. 10.1021/nn201010q
86. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2020 May;57(5):2461-2478. doi: 10.1007/s12035-020-01892-8.
87. Ahmadipour Y, Gembruch O, Pierscianek D, Sure U, Jabbarli R. Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival? *Neurochirurgie.* 2020;66(3):150-154. doi: 10.1016/j.neuchi.2019.12.012
88. Ahmed SI, Javed G, Laghari AA, Bareeqa SB, Farrukh S, et al. CD133 Expression in Glioblastoma Multiforme: A Literature Review. *Cureus.* 2018 Oct 11;10(10): e3439. doi: 10.7759/cureus.3439
89. Akhigbe RE, Ajayi AF, Ram SK. Oxidative Stress and Cardiometabolic Disorders. *Biomed Res Int.* 2021 Nov 5;2021: 9872109.doi: 10.1155/2021/9872109.
90. Alaverdyan A.E. Volkova L.V. Clinical and morphological features of glioblastomas *European Journal of Natural History.* – 2021. – № 1 – P. 28-32 DOI 10.17513/ejnh.34145

91. Albert ML, Darnell RB. Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):36-44. doi: 10.1038/nrc1255
92. Alghanim KK, Gasmelseed BG. Kaposi's sarcoma associated with adult dermatomyositis. *Saudi Med J*. 2021 May;42(5):570-573. doi: 10.15537/smj.2021.42.5.20200583
93. Alhowail A, Almogbel Y. Metformin administration increases the survival rate of doxorubicin-treated mice. *Pharmazie*. 2019 Dec 1;74(12):737-739. doi: 10.1691/ph.2019.9777
94. Alkhaibary A, Alassiri AH, AlSufiani F, Alharbi MA. Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter? *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2019 Jun;12(2):82-88. doi: 10.1016/j.hemonc.2018.11.001.
95. Al-Malky HS, Al Harthi SE, Osman AM. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J Oncol Pharm Pract*. 2020 Mar;26(2):434-444. doi:10.1177/1078155219877931.
96. Alyautdin R, Gothier D, Petrov V, Kharkevich D, Kreuter J. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 1995;41:44–8.
97. Alyautdin RN, Petrov VE, Langer K, et al. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm Res*. 1997 Mar;14(3):325-8. doi: 10.1023/a:1012098005098.
98. Amacher DE. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1998;27(2):119–30. DOI: 10.1006/rtph.1998.1201.
99. Ambruosi A, Gelperina S, Khalansky A, Tanski S, et al. Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model. *J Microencapsul*. 2006;23(5):582-592. doi:10.1080/02652040600788080
100. Amirian ES, Zhou R, Wrensch MR, et al. Approaching a Scientific Consensus on the Association between Allergies and Glioma Risk: A Report from the Glioma International Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(2):282-290. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0847
101. Anchordoquy TJ, Simberg D. Watching the gorilla and questioning delivery dogma. *J Control Release*. 2017 Sep 28; 262:87-90. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.021.
102. Anchordoquy TJ, Simberg D. Watching the gorilla and questioning delivery dogma. *J Control Release*. 2017 Sep 28; 262:87-90. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.021.
103. André-Grégoire G, Douanne T., Thys A., et al. The Necroptosis Effector MLKL drives Small Extracellular Vesicle Release and Tumour Growth in Glioblastoma bioRxiv 2021.01.12.426398; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.426398>
104. Anggriani L., Yasmin A., Wulandari R.A., G.M.Leksono et al., "Extract of temu ireng (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) rhizome reduces doxorubicin-induced immunosuppressive effects", AIP Conference Proceedings 2099, 020001 (2019) <https://doi.org/10.1063/1.5098406>
105. Annovazzi L, Mellai M, Schiffer D. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2017 May 26;9(6):57. doi: 10.3390/cancers9060057

106. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015 Dec 7;44(23):8576-607. doi: 10.1039/c5cs00541h
107. Armocida D, Frati A, Salvati M, Santoro A, Pesce A. Is Ki-67 index overexpression in IDH wild type glioblastoma a predictor of shorter Progression Free survival? A clinical and Molecular analytic investigation. *Clin Neurol Neurosurg.* 2020 Nov; 198:106126. doi: 10.1016/j.clineuro.2020.106126.
108. Aronson J.K. Nitrosourea cytotoxic drugs, Editor(s): effects of Drugs (Sixteenth Edition), Elsevier, 2016, Pages 219-220, ISBN 9780444537164, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01160-4>.
109. Aryal M, Vykhodtseva N, Zhang YZ, Park J, McDannold N. Multiple treatments with liposomal doxorubicin and ultrasound-induced disruption of blood-tumor and blood-brain barriers improve outcomes in a rat glioma model. *J Control Release.* 2013;169(1-2):103-111. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.007
110. Asaad GF, Hassan A, Mostafa RE. Anti-oxidant impact of Lisinopril and Enalapril against acute kidney injury induced by doxorubicin in male Wistar rats: involvement of kidney injury molecule-1. *Heliyon.* 2021 Jan 15;7(1): e05985. doi: 10.1016/j.heliyon. 2021.e05985.
111. Aukunuru JV, Ayalasmayajula SP, Kompella UB. Nanoparticle formulation enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells. *J Pharm Pharmacol.* 2003 Sep;55(9):1199-206. doi: 10.1211/0022357021701
112. Baba AI, Cătoi C. Comparative Oncology. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy; 2007. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9557/>
113. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell.* 2002 Apr;1(3):269-77. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00046-6.
114. Bae SY, Guan N, Yan R, Warner K, et al. Correction: Measurement and models accounting for cell death capture hidden variation in compound response. *Cell Death Dis.* 2020 Aug 24;11(8):699. doi: 10.1038/s41419-020-2576-z.
115. Bagalkot V, Lee IH, Yu MK, Lee E, et al. A combined chemoimmunotherapy approach using a plasmid-doxorubicin complex. *Mol Pharm.* 2009 May-Jun;6(3):1019-28. doi: 10.1021/mp800177f
116. Baklaushev VP, Nukolova NN, Khalansky AS, et al. Treatment of glioma by cisplatin-loaded nanogels conjugated with monoclonal antibodies against Cx43 and BSAT1. *Drug Deliv.* 2015;22(3):276-285. doi:10.3109/10717544.2013.876460
117. Balabanov R, Washington R, Wagnerova J, Dore-Duffy P. CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2. *Microvasc Res.* 1996;52(2):127-142. doi:10.1006/mvre.1996.0049

118. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004;16(1):1-13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016
119. Banks WA, Rhea EM. The Blood-Brain Barrier, Oxidative Stress, and Insulin Resistance. *Antioxidants (Basel).* 2021 Oct 27;10(11):1695. doi: 10.3390/antiox10111695.
120. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol.* 2018 Jul 2;217(7):2291-2298. doi: 10.1083/jcb.201804161.
121. Barakat BM, Ahmed HI, Bahr HI, Elbahaie AM. Protective Effect of Boswellic Acids against Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity: Impact on Nrf2/HO-1 Defense Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Feb 6; 2018:8296451. doi: 10.1155/2018/8296451
122. Bartels AL. Blood-brain barrier P-glycoprotein function in neurodegenerative disease. *Curr Pharm Des.* 2011;17(26):2771-2777. doi:10.2174/138161211797440122
123. Barth RF. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol.* 1998;36(1):91-102. doi:10.1023/a:1005805203044
124. Basso C., Calabrese, F., Angelini, A. et al. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev* 18, 673–681 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10741-012-9355-6>
125. Bastos AGP, Carvalho B, Silva R, Leitão D, et al. Endoglin (CD105) and proliferation index in recurrent glioblastoma treated with anti-angiogenic therapy. *Front Oncol.* 2022 Sep 6; 12:910196. doi: 10.3389/fonc.2022.910196
126. Belykh E, Shaffer KV, Lin C, Byvaltsev VA, Preul MC, Chen L. Blood-Brain Barrier, Blood-Brain Tumor Barrier, and Fluorescence-Guided Neurosurgical Oncology: Delivering Optical Labels to Brain Tumors. *Front Oncol.* 2020 Jun 5; 10:739. doi: 10.3389/fonc.2020.00739
127. Benzer F, Kandemir FM, Kucukler S, Comaklı S, Caglayan C. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. *Arch Physiol Biochem.* 2018 Dec;124(5):448-457. doi: 10.1080/13813455.2017.1422766.
128. Bette S, Barz M, Wiestler B, Huber T, Gerhardt J, et al. Prognostic Value of Tumor Volume in Glioblastoma Patients: Size Also Matters for Patients with Incomplete Resection. *Ann Surg Oncol.* 2018 Feb;25(2):558-564. doi: 10.1245/s10434-017-6253-0
129. Beutel O, Maraspini R, Pombo-García K, Martin-Lemaitre C, Honigmann A. Phase Separation of Zonula Occludens Proteins Drives Formation of Tight Junctions. *Cell.* 2019 Oct 31;179(4):923-936.e11. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.011.
130. Bhagat A, Kleinerman ES. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Causes, Mechanisms, and Prevention. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1257:181-192. doi: 10.1007/978-3-030-43032-0_15.
131. Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):806-815. doi: 10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b
132. Blinova EV, Dudina MO, Suslova IR, Samishina EA, et al. Novel aminochromone derivative inhibits tumor growth on xenograft model of lung cancer in mice. *J Adv Pharm Technol Res.* 2018;9(4):130-134. doi:10.4103/japtr.JAPTR_313_18

133. Bloch O, Manley GT. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema. *Neurosurg Focus*. 2007 May 15;22(5): E3. doi: 10.3171/foc.2007.22.5.4
134. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res*. 2016;33(10):2373-2387. doi:10.1007/s11095-016-1958-5
135. Bodor, N.; Buchwald, P.; *Retrometabolic Drug Design and Targeting*, 1-е изд., Wiley & Sons, 2012
136. Bogdanov A, Bogdanov A, Chubenko V, Volkov N, et al. Tumor acidity: From hallmark of cancer to target of treatment. *Front Oncol*. 2022 Aug 29; 12:979154. doi: 10.3389/fonc.2022.979154.
137. Braakhuis HM, Kloet SK, Kezic S, Kuper F, Park MV, et al. Progress and future of in vitro models to study translocation of nanoparticles. *Arch Toxicol*. 2015 Sep;89(9):1469-95. doi: 10.1007/s00204-015-1518-5
138. Brandhonneur N, Boucaud Y, Verger A, Dumait N, Molard Y, et al. Molybdenum cluster loaded PLGA nanoparticles as efficient tools against epithelial ovarian cancer. *Int J Pharm*. 2021 Jan 5; 592:120079. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120079
139. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492.
140. Brayfield A. "Doxorubicin". *Martindale: The Complete Drug Reference*. Adelaide: The Australian Medicines Handbook Unit Trust., ed. (19 December 2013). Pharmaceutical Press. Retrieved 15 April 2014.
141. Bredel M, Piribauer M, Marosi C, Birner P, Gatterbauer B, et al. High expression of DNA topoisomerase IIalpha and Ki-67 antigen is associated with prolonged survival in glioblastoma patients. *Eur J Cancer*. 2002 Jul;38(10):1343-7. doi: 10.1016/s0959-8049(02)00065-5
142. Brocato TA, Coker EN, Durfee PN, et al. Understanding the Connection between Nanoparticle Uptake and Cancer Treatment Efficacy using Mathematical Modeling. *Sci Rep*. 2018 May 24;8(1):7538. doi: 10.1038/s41598-018-25878-8.
143. Bryukhovetskiy I, Bryukhovetskiy A, Khotimchenko Y, Mischenko P. Novel cellular and post-genomic technologies in the treatment of glioblastoma multiforme (Review). *Oncol Rep*. 2016 Feb;35(2):639-48. doi: 10.3892/or.2015.4404.
144. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*. 2017 Mar 27;9(2):12. doi: 10.3390/pharmaceutics9020012.
145. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*. 1990 Oct; 429:47-62. doi: 10.1113/jphysiol.1990.sp018243.
146. Caban-Toktas S, Sahin A, Lule S, Esendagli G, Vural I, Karlı Oguz K, Soylemezoglu F, et al. Combination of Paclitaxel and R-flurbiprofen loaded PLGA nanoparticles suppresses glioblastoma growth on systemic administration. *Int J Pharm*. 2020 Mar 30; 578:119076. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119076.

147. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol.* 2011 Oct 23;6(12):815-23. doi: 10.1038/nnano.2011.166.
148. Caforio Alida L. P., et al., Current state of knowledge on etiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases, *European Heart Journal*, Volume 34, Issue 33, 1 September 2013, Pages 2636–2648, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh210>
149. Campbell SC, Muñoz-Ballester C, Chaunsali L, Mills WA 3rd, Yang JH, et al. Potassium and glutamate transport is impaired in scar-forming tumor-associated astrocytes. *Neurochem Int.* 2020 Feb; 133:104628. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104628.
150. Campello E, Ilich A, Simioni P, Key NS. The relationship between pancreatic cancer and hypercoagulability: a comprehensive review on epidemiological and biological issues. *Br J Cancer.* 2019 Aug;121(5):359-371. doi: 10.1038/s41416-019-0510-x.
151. Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol.* 2007;85(2):133-148. doi:10.1007/s11060-007-9400-9
152. Capper D., Reifenberger G., et al. EANO guideline on rational molecular testing of gliomas, glioneuronal, and neuronal tumors in adults for targeted therapy selection. *Neuro Oncol.* 2023 May 4;25(5):813-826. doi: 10.1093/neuonc/noad008. PMID: 36632791; PMCID: PMC10158123.
153. Caracciolo V., D'Agostino L., Dráberová E., Sládková V., Crozier-Fitzgerald C., et al. Differential expression and cellular distribution of γ -tubulin and β III-tubulin in medulloblastomas and human medulloblastoma cell lines. *J. Cell. Physiol.* 2010; 223:519–529. doi: 10.1002/jcp.22077.
154. Caragher SP, Shireman JM, Huang M, Miska J, Atashi F, et al. Activation of Dopamine Receptor 2 Prompts Transcriptomic and Metabolic Plasticity in Glioblastoma. *J Neurosci.* 2019 Mar 13;39(11):1982-1993. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1589-18.2018
155. Caramanti R, Aprígio RM, D Aglio Rocha CE, Morais DF, Góes MJ, et al. Is Edema Zone Volume Associated with Ki-67 Index in Glioblastoma Patients? *Cureus.* 2022 Apr 18;14(4): e24246. doi: 10.7759/cureus.24246.
156. Caruso G, Caffo M, Alafaci C, et al. Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? *Nanomedicine.* 2011;7(6):744-752. doi: 10.1016/j.nano.2011.02.008
157. Carvalho B, Lopes JM, Silva R, Peixoto J, Leitão D, Soares P, Fernandes AC, et al. The role of c-Met and VEGFR2 in glioblastoma resistance to bevacizumab. *Sci Rep.* 2021 Mar 16;11(1):6067. doi: 10.1038/s41598-021-85385-1.
158. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 2014 Jan;34(1):106-35. doi: 10.1002/med.21280

159. Cengiz O, Baran M, Balcioglu E, Suna PA, Bilgici P, Goktepe O, Onder GO, Goc R, Yay A. Use of selenium to ameliorate doxorubicin induced hepatotoxicity by targeting pro-inflammatory cytokines. *Biotech Histochem.* 2021 Jan;96(1):67-75. doi: 10.1080/10520295.2020.1760353
160. Chang CC, Liou CB, Su MJ, Lee YC, Liang CT, Ho JL, Tsai HW, Yen TH, Chu FY. Creatine Kinase (CK)-MB-to-Total-CK Ratio: A Laboratory Indicator for Primary Cancer Screening. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(15):6599-603. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.15.6599
161. Chang F, Deere H, Mahadeva U, George S. Histopathologic examination and reporting of esophageal carcinomas following preoperative neoadjuvant therapy: practical guidelines and current issues. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129:252–262.
162. Chang J, Paillard A, Passirani C, et al. Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells. *Pharm Res.* 2012;29(6):1495-1505. doi:10.1007/s11095-011-0624-1
163. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology.* 2010;115(2):155-62. doi: 10.1159/000265166
164. Chen W, Dong J, Haiech J, Kilhoffer MC, Zeniou M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:1740936. doi: 10.1155/2016/1740936
165. Chen W, Wang D, Du X, et al. (2015) Glioma cells escaped from cytotoxicity of temozolomide and vincristine by communicating with human astrocytes. *Med Oncol* 32:43. doi: 10.1007/s12032-015-0487-0
166. Chen W, Xia T, Wang D, Huang B, Zhao P, Wang J, Qu X, Li X. Human astrocytes secrete IL-6 to promote glioma migration and invasion through upregulation of cytomembrane MMP14. *Oncotarget.* 2016 Sep 20;7(38):62425-62438. doi: 10.18632
167. Cheng H, Huo L, Wang D, Xiang Y. Concurrence of ovarian cancer and dermatomyositis: a propensity score analysis. *J Gynecol Oncol.* 2019 Nov;30(6): e99. doi: 10.3802/jgo.2019.30.e99
168. Chiarelli PA, Kievit FM, Zhang M, Ellenbogen RG. Bionanotechnology and the future of glioma. *Surg Neurol Int.* 2015;6(Suppl 1): S45-S58. Published 2015 Feb 13. doi:10.4103/2152-7806.151334
169. Choi CH, Zuckerman JE, Webster P, Davis ME. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(16):6656-6661. doi:10.1073/pnas.1103573108
170. Choi HS, Ipe BI, Misra P, Lee JH, Bawendi MG, Frangioni JV. Tissue- and organ-selective biodistribution of NIR fluorescent quantum dots. *Nano Lett.* 2009 Jun;9(6):2354-9. doi: 10.1021/nl900872r
171. Christidi E, Brunham LR. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis.* 2021 Apr 1;12(4):339. doi: 10.1038/s41419-021-03614-x.
172. Civita P, Valerio O, Naccarato AG, Gumbleton M, Pilkington GJ. Satellitosis, a Crosstalk between Neurons, Vascular Structures and Neoplastic Cells in Brain Tumours; Early

- Manifestation of Invasive Behaviour. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 11;12(12):3720. doi: 10.3390/cancers12123720.
173. Constantinou A., Georgiou T. Pre-clinical and clinical applications of thermoreversible hydrogels in biomedical engineering: A review. *Polymer International*. 2021. 70. doi:10.1002/pi.6266.
174. Costa LES, Clementino-Neto J, Mendes CB, et al. Evidence of Aquaporin 4 Regulation by Thyroid Hormone During Mouse Brain Development and in Cultured Human Glioblastoma Multiforme Cells. *Front Neurosci*. 2019 Apr 4; 13:317. doi: 10.3389/fnins.2019.00317
175. Costantino L. Drug delivery to the CNS and polymeric nanoparticulate carriers. *Future Med Chem*. 2010 Nov;2(11):1681-701. doi: 10.4155/fmc.10.249.
176. Cotechini T, Atallah A, Grossman A. Tissue-Resident and Recruited Macrophages in Primary Tumor and Metastatic Microenvironments: Potential Targets in Cancer Therapy. *Cells*. 2021 Apr 20;10(4):960. doi: 10.3390/cells10040960.
177. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):135-146. doi:10.1038/nrc3670
178. Couvreur P, Kante B, Grislain L, Roland M, Speiser P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *J Pharm Sci*. 1982 Jul;71(7):790-2. doi: 10.1002/jps.2600710717
179. Couvreur P. Les nanotechnologies pour la conception de nouveaux médicaments [Nanotechnologies for designing new medicines]. *Biol Aujourd'hui*. 2012;206(4):237-248. doi:10.1051/jbio/2012025
180. Couvreur P., Grislain L., Lenaerts V. et. al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug carrier for antitumor agents. In: Guiot, P., Couvreur, P. (Eds.), *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, CRC Press. Boca Raton, FL. – 1986. – P. 27–93.
181. Da Ros M, De Gregorio V, Iorio AL, Giunti L, Guidi M, de Martino M, Genitori L, Sardi I. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 22;19(10):2879. doi: 10.3390/ijms19102879.
182. Dahlrot RH, Bangsø JA, Petersen JK, Rosager AM, Sørensen MD, et al. Prognostic role of Ki-67 in glioblastomas excluding contribution from non-neoplastic cells. *Sci Rep*. 2021 Sep 9;11(1):17918. doi: 10.1038/s41598-021-95958-9.
183. Dalefield R., *Veterinary Toxicology for Australia and New Zealand. Chapter 2 - Essentials of Toxicokinetics for Veterinary Practitioners*. Elsevier. 2017, Pages 5-17, ISBN 9780124202276, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420227-6.00002-5>.
184. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Control Release*. 2016 Dec 28;244(Pt A):108-121. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.11.015.
185. Darnell RB, DeAngelis LM. Regression of small-cell lung carcinoma in patients with paraneoplastic neuronal antibodies. *Lancet*. 1993 Jan 2;341(8836):21-2. doi: 10.1016/0140-6736(93)92485-c

186. Daumas-Duport C., Scheithauer B., O'Fallon J., Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988; 62(10): 2152–2165, [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19881115](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19881115)
187. de Los Santos-Jiménez J, Campos-Sandoval JA, Márquez-Torres C, et al. Glutaminase isoforms expression switches microRNA levels and oxidative status in glioblastoma cells. *J Biomed Sci.* 2021 Feb 20;28(1):14. doi: 10.1186/s12929-021-00712-y.
188. de Souza I, Ramalho MCC, Guedes CB, Osawa IYA, Monteiro LKS, et al. Ferroptosis Modulation: Potential Therapeutic Target for Glioblastoma Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 21;23(13):6879. doi: 10.3390/ijms23136879.
189. Dechant R, Binda M, Lee SS, Pelet S, Winderickx J, Peter M. Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J.* 2010 Aug 4;29(15):2515-26. doi: 10.1038/emboj.2010.138
190. Delgado JL, Hsieh CM, Chan NL, Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochem J.* 2018 Jan 23;475(2):373-398. doi: 10.1042/BCJ20160583.
191. Dellapasqua S, Trillo Aliaga P, Munzone E, et al. Pegylated Liposomal Doxorubicin (Caelyx®) as Adjuvant Treatment in Early-Stage Luminal B-like Breast Cancer: A Feasibility Phase II Trial. *Curr Oncol.* 2021 Dec 7;28(6):5167-5178. doi: 10.3390/curroncol28060433
192. Demir F, Demir M, Aygun H. Evaluation of the protective effect of edaravone on doxorubicin nephrotoxicity by [99mTc] DMSA renal scintigraphy and biochemical methods. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020 Aug;393(8):1383-1390. doi: 10.1007/s00210-020-01832-2
193. Deng L, Li L, Yang H, et al. Development and optimization of doxorubicin loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanobubbles for drug delivery into HeLa cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(4):2947-2954. doi:10.1166/jnn.2014.8633
194. Deng Z, Sheng Z, Yan F. Ultrasound-Induced Blood-Brain-Barrier Opening Enhances Anticancer Efficacy in the Treatment of Glioblastoma: Current Status and Future Prospects. *J Oncol.* 2019 Nov 3; 2019:2345203. doi: 10.1155/2019/2345203.
195. Dhoot AS, Just C, Bursztyn LL. Paraneoplastic Ophthalmoplegia as the Presenting Sign of Paediatric Glioblastoma Multiforme: A Case Report. *Neuroophthalmology.* 2020 Sep 22;45(6):397-402. doi: 10.1080/01658107.2020.1817098.
196. di Tomaso E, Snuderl M, Kamoun WS, Duda DG, Auluck PK, Fazlollahi L, et al. Glioblastoma recurrence after cediranib therapy in patients: lack of "rebound" revascularization as mode of escape. *Cancer Res.* 2011 Jan 1;71(1):19-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2602. Erratum in: *Cancer Res.* 2011 Mar 15;71(6):2405.
197. Dieci MV, Griguolo G, Bottosso M, Tsvetkova V, Giorgi CA, Vernaci G, Michieletto S, et al. Impact of estrogen receptor levels on outcome in non-metastatic triple negative breast cancer patients treated with neoadjuvant/adjuvant chemotherapy. *NPJ Breast Cancer.* 2021 Aug 2;7(1):101. doi: 10.1038/s41523-021-00308-7.
198. Djabir YY, Arsyad MA, Sartini S, Lallo S. Potential Roles of *Kleinhovia hospita* L. Leaf Extract in Reducing Doxorubicin Acute Hepatic, Cardiac and Renal Toxicities in Rats. *Pharmacognosy Res.* 2017 Apr-Jun;9(2):168-173. doi: 10.4103/pr.pr_129_16.

199. Donelli MG, Zucchetti M, D'Incalci M. Do anticancer agents reach the tumor target in the human brain? *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992;30(4):251-260. doi:10.1007/BF00686291
200. Donnem T, Hu J, Ferguson M, Adighibe O, Snell C, Harris AL, Gatter KC, Pezzella F. Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med.* 2013 Aug;2(4):427-36. doi: 10.1002/cam4.105
201. Dragojevic S, Mackey R, Raucher D. Evaluation of Elastin-Like Polypeptides for Tumor Targeted Delivery of Doxorubicin to Glioblastoma. *Molecules.* 2019 Sep 6;24(18):3242. doi: 10.3390/molecules24183242.
202. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev.* 1999 Dec;51(4):691-743
203. Durmus S, Xu N, Sparidans RW, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH. P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) restrict brain accumulation of the JAK1/2 inhibitor, CYT387. *Pharmacol Res.* 2013; 76:9-16. doi: 10.1016/j.phrs.2013.06.009
204. Dutch Breast Cancer Research Group (BOOG). Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Dec;19(12):1630-1640. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30570-9
205. Dyhrfort P, Shen Q, Clausen F, Thulin M, Enblad P, Kamali-Moghaddam M, Lewén A, Hillered L. Monitoring of Protein Biomarkers of Inflammation in Human Traumatic Brain Injury Using Microdialysis and Proximity Extension Assay Technology in Neurointensive Care. *J Neurotrauma.* 2019 Oct 15;36(20):2872-2885. doi: 10.1089/neu.2018.6320.
206. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in premenopausal women with oestrogen receptor-positive early-stage breast cancer treated with ovarian suppression: a patient-level meta-analysis of 7030 women from four randomised trials. *Lancet Oncol.* 2022 Mar;23(3):382-392. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00758-0
207. Eguchi R, Kawabe JI, Wakabayashi I. VEGF-Independent Angiogenic Factors: Beyond VEGF/VEGFR2 Signaling. *J Vasc Res.* 2022;59(2):78-89. doi: 10.1159/000521584
208. Eichhoff U. Concerning to Laboratory Animals for MRI and MR Spectroscopy, Bruker Biospin MRI GmbH, D76275 Ettlingen, Germany // Медицинская визуализация. 2003. № 3.
209. Eidizadeh A, von Ahsen N, Friedewald S, Binder L. Macro-CK type 2 in metastatic prostate cancer. *Diagnosis (Berl).* 2019 Aug 27;6(3):307-309. doi: 10.1515/dx-2018-0039
210. El-Sayed EM, Mansour AM, El-Sawy WS. Protective effect of proanthocyanidins against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2017 Nov;31(11). doi: 10.1002/jbt.21965
211. Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, Kim WH, Yoon G, Choi KS. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through

- mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*. 2005 Jul 14;24(30):4765-77. doi: 10.1038/sj.onc.1208627.
212. Erenpreisa J, Cragg MS. Cancer: a matter of life cycle? *Cell Biol Int*. 2007 Dec;31(12):1507-10. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.08.013.
213. Erenpreisa J, Cragg MS. Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal. *Cancer Cell Int*. 2013 Sep 11;13(1):92. doi: 10.1186/1475-2867-13-92.
214. Erickson MA, Banks WA. Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. *Pharmacol Rev*. 2018 Apr;70(2):278-314. doi: 10.1124/pr.117.014647
215. Esim O, Ozkan CK, Sarper M, Savaser A, Ozkan Y. Development of Gemcitabine Loaded PLGA/Lecithin Nanoparticles for Non-Small Cell Lung Cancer Therapy. *Curr Drug Deliv*. 2020;17(7):622-628. doi: 10.2174/1567201817666200512094145.
216. Essa D, Kondiah PPD, Choonara YE, Pillay V. The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Feb 11; 8:48. doi: 10.3389/fbioe.2020.00048.
217. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18.III.1986
218. Ewend MG, Brem S, Gilbert M, Goodkin R, Penar PL, Varia M, et al. (June 2007). "Treatment of single brain metastasis with resection, intracavity carmustine polymer wafers, and radiation therapy is safe and provides excellent local control". *Clinical Cancer Research*. 13 (12): 3637–41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2095.
219. Fabry Z, Sandor M, Gajewski TF, et al. Differential activation of Th1 and Th2 CD4+ cells by murine brain microvessel endothelial cells and smooth muscle/pericytes. *J Immunol*. 1993;151(1):38-47.
220. Fana M, Gallien J, Srinageshwar B, Dunbar GL, Rossignol J. PAMAM Dendrimer Nanomolecules Utilized as Drug Delivery Systems for Potential Treatment of Glioblastoma: A Systematic Review. *Int J Nanomedicine*. 2020 Apr 23; 15:2789-2808. doi: 10.2147/IJN.S243155.
221. Farahani, Ramin M.; Rezaei-Lotfi, Saba; Simonian, Mary; Xaymardan, Munira; Hunter, Neil (2019). "Neural microvascular pericytes contribute to human adult neurogenesis". *Journal of Comparative Neurology*. 527 (4): 780–796. doi:10.1002/cne.24565. ISSN 1096-9861.
222. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006 Jan;7(1):21-33. doi: 10.1038/nrg1748
223. Fianco G, Mongiardi MP, Levi A, De Luca T, et al. Caspase-8 contributes to angiogenesis and chemotherapy resistance in glioblastoma. *Elife*. 2017 Jun 8;6: e22593. doi: 10.7554/eLife.22593.
224. Fidoamore A, Cristiano L, Antonosante A, et al. Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:6809105. doi: 10.1155/2016/6809105

225. Filon O., Krivorotko P., Kobayakov G., Razjivina, V., Maximenko O., Gelperina S., Kreuter J. (2017). A phase I study of safety and pharmacokinetics of NanoBB-1-Dox in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 35. e13537-e13537. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e13537
226. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res*. 1998 Jan;4(1):1-6.
227. Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*. 2012 Nov 23;338(6110):1080-4. doi: 10.1126/science.1226929.
228. Fromm M. *Physiologie des Menschen // Transport in Membranen und Epithelien / R. F. Schmidt, F. Lang. — 2010- Verlag Springer. — C. 41—54. — ISBN 978-3-540-32908-4.*
229. Fujiwara A., Hoshino T., Westley J. W. Anthracycline antibiotics // *Critical Reviews in Biotechnology*. 1985. T. 3. №. 2. C. 133-157.
230. Fukasawa H, Furuya R, Yasuda H, Yamamoto T, et al. Anti-cancer agent-induced nephrotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;14(7):921-7. doi: 10.2174/1871520614666140127105809
231. Galanis E, Russell S. Cancer gene therapy clinical trials: lessons for the future. *Br J Cancer*. 2001 Nov 16;85(10):1432-6. doi: 10.1054/bjoc.2001.2129.
232. Gallego O (August 2015). "Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma". *Current Oncology*. 22 (4): e273–81. doi:10.3747/co.22.2436.
233. Gelperina S, Maksimenko O, Khalansky A, Vanchugova L, Shipulo E, et al. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010 Feb;74(2):157-63. doi: 10.1016/j.ejpb.2009.09.003
234. Gelperina SE, Khalansky AS, Skidan IN, Smirnova ZS, Bobruskin AI, et al. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. *Toxicol Lett*. 2002 Jan 25;126(2):131-41. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00456-8.
235. Gerstner ER, Fine RL. Increased permeability of the blood-brain barrier to chemotherapy in metastatic brain tumors: establishing a treatment paradigm. *J Clin Oncol*. 2007;25(16):2306-2312. doi:10.1200/JCO.2006.10.0677
236. Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, et al. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol*. 2008 Aug 1;26(22):3777-84. doi: 10.1200/JCO.2007.14.9401.
237. Giboney PT. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician*. 2005 Mar 15;71(6):1105-10. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2005 Jul 1;72(1):41.
238. Gillespie S, Monje M. An active role for neurons in glioma progression: making sense of Scherer's structures. *Neuro Oncol*. 2018 Sep 3;20(10):1292-1299. doi: 10.1093/neuonc/noy083.
239. Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT, et al. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci*. 1999;19(7):2799-2806. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-07-02799.1999

240. Goldman L, Schafer AI. *Goldman-Cecil Medicine* / Edited by Lee Goldman, Andrew I. Schafer. 26th edition. (Goldman L, Schafer AI, eds.). Elsevier; 2020 ISBN:9780323532662
241. Gotama K. T., Soetikno V., et al. Hepatoprotective effects of l-citrulline against doxorubicin-induced liver damage in rats: an analysis of serum biomarkers. *Int J App Pharm*, Vol 11, Special Issue 1, 2019
242. Grant MKO, Seelig DM, Sharkey LC, Choi WSV, Abdelgawad IY, Zordoky BN. Sexual dimorphism of acute doxorubicin-induced nephrotoxicity in C57Bl/6 mice. *PLoS One*. 2019 Feb 20;14(2): e0212486. doi: 10.1371/journal.pone.0212486
243. Grumezescu A. M., *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, William Andrew Publishing, 2019, Pages 1-603, ISBN 9780128165041, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816504-1.00018-1>.
244. Gu, P., Liu, Z., Sun, Y., Ou, N., Hu, Y., Liu, J., et al. (2019). Angelica Sinensis Polysaccharide Encapsulated into PLGA Nanoparticles as a Vaccine Delivery and Adjuvant System for Ovalbumin to Promote Immune Responses. *Int. J. Pharmaceutics* 554, 72–80. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.11.008
245. Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, Antropov AS, Kivman GY, Kreuter J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm Res*. 1999 Oct;16(10):1564-9. doi: 10.1023/a:1018983904537.
246. Guo Y, Guo Y, Chen C, Fan D, Wu X, Zhao L, Shao B, Sun Z, Ji Z. Circ3823 contributes to growth, metastasis and angiogenesis of colorectal cancer: involvement of miR-30c-5p/TCF7 axis. *Mol Cancer*. 2021 Jun 25;20(1):93. doi: 10.1186/s12943-021-01372-0.
247. Haibe Y, Kreidieh M, El Hajj H, Khalifeh I, Mukherji D, Temraz S, Shamseddine A. Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Front Oncol*. 2020 Feb 27; 10:221. doi: 10.3389/fonc.2020.00221.
248. Halle B, Mongelard K, Poulsen FR. Convection-enhanced Drug Delivery for Glioblastoma: A Systematic Review Focused on Methodological Differences in the Use of the Convection-enhanced Delivery Method. *Asian J Neurosurg*. 2019 Jan-Mar;14(1):5-14. doi: 10.4103/ajns.AJNS_302_17.
249. Han Y, Park JH. Convection-enhanced delivery of liposomal drugs for effective treatment of glioblastoma multiforme. *Drug Deliv Transl Res*. 2020;10(6):1876-1887. doi:10.1007/s13346-020-00773-w
250. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
251. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
252. Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, et al. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun*. 2019;10(1):5816. Published 2019 Dec 20. doi:10.1038/s41467-019-13812-z
253. Hausmann, D., Hoffmann, D.C., Venkataramani, V. et al. Autonomous rhythmic activity in glioma networks drives brain tumour growth. *Nature* (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05520-4>.

254. Heesters MA, Koudstaal J, Go KG, Molenaar WM. Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas: prognostic and clinical value. *J Neurooncol.* 1999;44(3):255-66. doi: 10.1023/a:1006398613605
255. Hekmatara T, Bernreuther C, Khalansky AS, Theisen A, et al. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects. *Clin Neuropathol.* 2009 May-Jun;28(3):153-64. doi: 10.5414/npp28153
256. Henker C, Kriesen T, Schneider B, Glass Ä, Scherer M, Langner S, Erbersdobler A, Piek J. Correlation of Ki-67 Index with Volumetric Segmentation and its Value as a Prognostic Marker in Glioblastoma. *World Neurosurg.* 2019 May;125: e1093-e1103. doi: 10.1016/j.wneu.2019.02.006
257. Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, Frenking JH, Wurm J, et al. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun.* 2019 Jun 11;10(1):2541. doi: 10.1038/s41467-019-10493-6
258. Herrmann IK, Wood MJA, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol.* 2021;16(7):748-759. doi:10.1038/s41565-021-00931-2
259. Hinkley JM, Morton AB, Ichinoseki-Sekine N, Huertas AM, Smuder AJ. Exercise Training Prevents Doxorubicin-induced Mitochondrial Dysfunction of the Liver. *Med Sci Sports Exerc.* 2019 Jun;51(6):1106-1115. doi: 10.1249/MSS.0000000000001887
260. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996;32(4):687-698.
261. Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(3):168-182. doi:10.1038/nri.2017.131
262. Huang X, Hussain B, Chang J. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neurosci Ther.* 2021 Jan;27(1):36-47. doi: 10.1111/cns.13569
263. Huang X, Li L, Liu T, Hao N, Liu H, Chen D, Tang F. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano.* 2011 Jul 26;5(7):5390-9. doi: 10.1021/nn200365a
264. Huang YT, Zhang Y, Wu Z, Michaud DS. Genotype-based gene signature of glioma risk. *Neuro Oncol.* 2017 Jul 1;19(7):940-950. doi: 10.1093/neuonc/now288.
265. Hubbard JA, Hsu MS, Seldin MM, Binder DK. Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain. *ASN Neuro.* 2015 Oct 21;7(5):1759091415605486. doi: 10.1177/1759091415605486.
266. Huwyler J, Wu D, Pardridge WM. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(24):14164-14169. doi:10.1073/pnas.93.24.14164
267. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007 Nov;10(11):1369-76. doi: 10.1038/nn2003
268. Ikewuchi CC, Ifeanchi MO, Ikewuchi JC. Moderation of doxorubicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats by aqueous leaf-extracts of *Chromolaena odorata* and *Tridax*

- procumbens. *Porto Biomed J.* 2021;6(1): e129. Published 2021 Feb 11. doi: 10.1097/j.pbj.0000000000000129
269. Im WJ, Kim MG, Ha TK, Kwon SJ. Tumor size as a prognostic factor in gastric cancer patient. *J Gastric Cancer.* 2012 Sep;12(3):164-72. doi: 10.5230/jgc.2012.12.3.164
270. Inturi S, Wang G, Chen F, Banda NK, Holers VM, Wu L, Moghimi SM, Simberg D. Modulatory Role of Surface Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoworms in Complement Opsonization and Leukocyte Uptake. *ACS Nano.* 2015 Nov 24;9(11):10758-68. doi: 10.1021/acsnano.5b05061
271. Irvin DM, McNeill RS, Bash RE, et al. (2017) Intrinsic Astrocyte Heterogeneity Influences Tumor Growth in Glioma Mouse Models. *Brain Pathol* 27: 36–50. doi: 10.1111/bpa.12348
272. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Nov;7(11):653-64. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.139.
273. Jawad B, Poudel L, Podgornik R, Steinmetz NF, Ching WY. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys Chem Chem Phys.* 2019 Feb 13;21(7):3877-3893. doi: 10.1039/c8cp06776g.
274. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res.* 2015 Dec;40(12):2583-99. doi: 10.1007/s11064-015-1581-6
275. Jeyabalan A, Trivedi M. Paraneoplastic Glomerular Diseases. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2022 Mar;29(2):116-126.e1. doi: 10.1053/j.ackd.2022.02.009
276. Jiang W, Huang Y, An Y, Kim BY. Remodeling Tumor Vasculature to Enhance Delivery of Intermediate-Sized Nanoparticles. *ACS Nano.* 2015 Sep 22;9(9):8689-96. doi: 10.1021/acsnano.5b02028.
277. Jiang X, Xin H, Sha X, et al. PEGylated poly(trimethylene carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel for the treatment of advanced glioma: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2011;420(2):385-394. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.08.052
278. Johnsen KB, Bak M, Melander F, et al. Modulating the antibody density changes the uptake and transport at the blood-brain barrier of both transferrin receptor-targeted gold nanoparticles and liposomal cargo. *J Control Release.* 2019; 295:237-249. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.01.005
279. Johnson D.R., Omuro A.M., Ravelo A., et al. Overall survival in patients with glioblastoma before and after bevacizumab approval // *Curr Med Res Opin.* 2017:1-8, doi.org/10.1080/03007995.2017.1392294
280. Johnson PJ, Rivard BC, Wood JH, DiRubio ML, Henry JG, Miller AD. Relationship between histological tumor margins and magnetic resonance imaging signal intensities in brain neoplasia of dogs. *J Vet Intern Med.* 2022 May;36(3):1039-1048. doi: 10.1111/jvim.16431.
281. Joshi DD, Anderson PM, Matsumoto J, Moir C, Shives T, Unni K, Lennon VA. Metastatic chondroblastoma with elevated creatine kinase and paraneoplastic neurologic autoimmunity. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003 Nov;25(11):900-4. doi: 10.1097/00043426-200311000-00015.

282. Kaczmarek A, Krysko O, Heyndrickx L, Løve Aaes T, et al. TNF/TNF-R1 pathway is involved in doxorubicin-induced acute sterile inflammation. *Cell Death Dis.* 2013 Dec 12;4(12):e961. doi: 10.1038/cddis.2013.496.
283. Kadry, H., Noorani, B. & Cucullo, L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS* 17, 69 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
284. Kajjarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 8;20(19):4968. doi: 10.3390/ijms20194968
285. Kamynina M, Tskhovrebova S, Fares J, Timashev P, et al. Oncolytic Virus-Induced Autophagy in Glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 12;13(14):3482. doi: 10.3390/cancers13143482.
286. Kanashiro A, Talbot J, Peres RS, et al. Neutrophil Recruitment and Articular Hyperalgesia in Antigen-Induced Arthritis are Modulated by the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016;119(5):453-457. doi:10.1111/bcpt.12611
287. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association.* 1958; 53:457–81.
288. Kato, K., Watanabe, M. Glioblastoma multiforme with epithelial appearance: a case report. *Brain Tumor Pathol* 16, 45–48 (1999). <https://doi.org/10.1007/BF02478901>
289. Kim BS, Kim CS, Lee KM. The intracellular uptake ability of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Arch Pharm Res.* 2008;31(8):1050–1054. doi:10.1007/s12272-001-1267-
290. Kim H, Lim KY, Park JW, Kang J, Won JK, et al. Sporadic and Lynch syndrome-associated mismatch repair-deficient brain tumors. *Lab Invest.* 2022 Feb;102(2):160-171. doi: 10.1038/s41374-021-00694-3.
291. Kim MH, Lee JR, Kim KJ, Jun JH, Hwang HJ, Lee W, Nam SH, Oh JE, Yoo YC. Identification for antitumor effects of tramadol in a xenograft mouse model using orthotopic breast cancer cells. *Sci Rep.* 2021 Nov 11;11(1):22113. doi: 10.1038/s41598-021-01701-9.
292. Kishore D, Khurana V, Raj A, Gambhir IS, Diwaker A. Hepatocellular carcinoma presenting as polymyositis: a paraneoplastic syndrome. *Ann Saudi Med.* 2011 Sep-Oct;31(5):533-5. doi: 10.4103/0256-4947.84636.
293. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Mar;61(3):215-25; discussion 226-9. doi: 10.1093/jnen/61.3.215.
294. Kojima C, Regino C, Umeda Y, Kobayashi H, Kono K. Influence of dendrimer generation and polyethylene glycol length on the biodistribution of PEGylated dendrimers. *Int J Pharm.* 2010 Jan 4;383(1-2):293-6. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.09.015
295. Kojima C, Turkbey B, Ogawa M, Bernardo M, Regino CA, Bryant LH Jr, et al. Dendrimer-based MRI contrast agents: the effects of PEGylation on relaxivity and pharmacokinetics. *Nanomedicine.* 2011 Dec;7(6):1001-8. doi: 10.1016/j.nano.2011.03.007

296. Kolar K, Freitas-Andrade M, Bechberger JF, Krishnan H, Goldberg GS, Naus CC, Sin WC. Podoplanin: a marker for reactive gliosis in gliomas and brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015 Jan;74(1):64-74. doi: 10.1097/NEN.0000000000000150.
297. Kovshova T, Osipova N, Alekseeva A, Malinovskaya J, Belov A, Budko A, et al. Exploring the Interplay between Drug Release and Targeting of Lipid-Like Polymer Nanoparticles Loaded with Doxorubicin. *Molecules*. 2021 Feb 5;26(4):831. doi: 10.3390/molecules26040831.
298. Krenzlin H, Behera P, Lorenz V, Passaro C, Zdioruk M, et al. Cytomegalovirus promotes murine glioblastoma growth via pericyte recruitment and angiogenesis. *J Clin Invest*. 2019 Mar 11;129(4):1671-1683. doi: 10.1172/JCI123375
299. Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, Ivanov AA. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res*. 1995 Mar 13;674(1):171-4. doi: 10.1016/0006-8993(95)00023-j. PMID: 7773690.
300. Kreuter J, Gelperina S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* (2008) 94:271–7. doi: 10.1177/030089160809400220
301. Kreuter J. Nanoparticulate systems in drug delivery and targeting. *J Drug Target*. 1995;3(3):171-3. doi: 10.3109/10611869509015940.
302. Kreyling WG, Hirn S, Möller W, Schleh C, Wenk A, Celik G, Lipka J, et al. Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS Nano*. 2014 Jan 28;8(1):222-33. doi: 10.1021/nn403256v. Epub 2013 Dec 30
303. Krivko I. M., Khalansky A.S., Beresin V.A. Influence of surrounding brain tissue upon the N-CAM expression in transplanted rat glioma cells. // *Clin Neuropath.* - 1992.- V.11.- № 4. - P. 268
- Kubat GB, Ozler M, Ulger O, Ekinci O, Atalay O, et al. The effects of mesenchymal stem cell mitochondrial transplantation on doxorubicin-mediated nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021 Jan;35(1): e22612. doi: 10.1002/jbt.22612.
304. Kucheryavenko AS, Chernomyrdin NV, Gavdush AA, et al. Terahertz dielectric spectroscopy and solid immersion microscopy of ex vivo glioma model 101.8: brain tissue heterogeneity. *Biomed Opt Express*. 2021 Jul 27;12(8):5272-5289. doi: 10.1364/BOE.432758
305. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
306. Kumskova N, Ermolenko Y, Osipova N, et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release. *J Microencapsul*. 2020;37(3):283-295. doi:10.1080/02652048.2020.1729885
307. Kutcher ME, Herman IM. The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res*. 2009 May;77(3):235-46. doi: 10.1016/j.mvr.2009.01.007.
308. Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Hinzmann M, Wierzbicki M, Hotowy A, et al. Investigation of platinum nanoparticle properties against U87 glioblastoma multiforme. *Arch Med Sci*. 2017 Oct;13(6):1322-1334. doi: 10.5114/aoms.2016.58925.

309. Lacouture M, Sibaud V. Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. *Am J Clin Dermatol*. 2018 Nov;19(Suppl 1):31-39. doi: 10.1007/s40257-018-0384-3.
310. Laquintana V, Trapani A, Denora N, Wang F, Gallo JM, Trapani G. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(10):1017-1032. doi:10.1517/17425240903167942
311. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 2013 Apr 12;112(8):1104-11. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301077
312. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-218. doi:10.1038/nature12213
313. Lawson HC, Sampath P, Bohan E, Park MC, Hussain N, Olivi A, et al. (May 2007). "Interstitial chemotherapy for malignant gliomas: the Johns Hopkins experience". *Journal of Neuro-Oncology*. 83(1): 61–70. doi:10.1007/s11060-006-9303-1.
314. Lazo M. "Liver Function". Johns Hopkins Medicine. Retrieved 7 July 2022.
315. Lee A, Arasaratnam M, Chan DLH, Khasraw M, Howell VM, Wheeler H. Anti-epidermal growth factor receptor therapy for glioblastoma in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 May 12;5(5):CD013238. doi: 10.1002/14651858.CD013238.pub2.
316. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16(1):30-38. doi:10.1111/j.1440-1797.2010.01383.x
317. Leece R, Xu J, Ostrom QT, Chen Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003-2007. *Neuro Oncol*. 2017; 19:1553-1564.
318. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973 Aug;32(2):302-14. doi: 10.1002/1097-0142(197308)32:2<302::aid-cnrc2820320205>3.0.co;2-2.
319. Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R, Tyler B, Brem H. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25(6B):3825-31. Erratum in: *Anticancer Res*. 2006 Jan-Feb;26(1a):445
320. Li B, Severson E, Pignon JC, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol*. 2016;17(1):174. Published 2016 Aug 22. doi:10.1186/s13059-016-1028-7
321. Li Y, Liu Y, Du B, Cheng G. Reshaping Tumor Blood Vessels to Enhance Drug Penetration with a Multistrategy Synergistic Nanosystem. *Mol Pharm*. 2020 Sep 8;17(9):3151-3164. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00077
322. Li, Y.; Li, N.; Ge, J.; et al. Biodegradable Thermal Imaging-Tracked Ultralong Nanowire-Reinforced Conductive Nanocomposites Elastomers with Intrinsic Efficient Antibacterial and Anticancer Activity for Enhanced Biomedical Application Potential. *Biomaterials* 2019, 201, 68– 76, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.02.013

323. Liang SF, Zuo FF, Yin BC, Ye BC. Delivery of siRNA based on engineered exosomes for glioblastoma therapy by targeting STAT3. *Biomater Sci.* 2022 Mar 15;10(6):1582-1590. doi: 10.1039/d1bm01723c.
324. Liang SF, Zuo FF, Yin BC, Ye BC. Delivery of siRNA based on engineered exosomes for glioblastoma therapy by targeting STAT3. *Biomater Sci.* 2022;10(6):1582-1590. Published 2022 Mar 15. doi:10.1039/d1bm01723c
325. Liebelt BD, Shingu T, Zhou X, Ren J, Shin SA, Hu J. Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:7849890. doi: 10.1155/2016/7849890
326. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct 17;99(20):1544-50. doi: 10.1093/jnci/djm170.
327. Liu D, Dai X, Ye L, Wang H, Qian H, Cheng H, Wang X. Nanotechnology meets glioblastoma multiforme: Emerging therapeutic strategies. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2023 Jan;15(1): e1838. doi: 10.1002/wnan.1838.
328. Liu H, Wang H, Xu Y, et al. Synthesis of PEGylated low generation dendrimer-entrapped gold nanoparticles for CT imaging applications. *Nanoscale.* 2014;6(9):4521-4526. doi:10.1039/c3nr06694k
329. Liu J, Yu M, Ning X, Zhou C, Yang S, Zheng J. PEGylation and zwitterionization: pros and cons in the renal clearance and tumor targeting of near-IR-emitting gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013 Nov 25;52(48):12572-6. doi: 10.1002/anie.201304465
330. Liu L, Venkatraman SS, Yang YY, et al. Polymeric micelles anchored with TAT for delivery of antibiotics across the blood-brain barrier. *Biopolymers.* 2008;90(5):617-623. doi:10.1002/bip.20998
331. Liu WY, Wang ZB, Wang Y, et al. Increasing the Permeability of the Blood-brain Barrier in Three Different Models in vivo. *CNS Neurosci Ther.* 2015;21(7):568-574. doi:10.1111/cns.12405
332. Liubich LD, Lisyany MI. Anticancer efficacy of allogeneic vaccine modified with progenitor neural cells supernatant in rats with glioma 101.8. *Exp Oncol.* 2015;37(3):203-207.
333. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury.* Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.
334. Logsdon AF, Erickson MA, Chen X, et al. Inter-alpha inhibitor proteins attenuate lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption and downregulate circulating interleukin 6 in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020;40(5):1090-1102. doi:10.1177/0271678X19859465
335. Loo C, Lin A, Hirsch L, et al. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2004;3(1):33-40. doi:10.1177/153303460400300104
336. Lotfipour F, Shahi S, Farjami A, Salatin S, Mahmoudian M, Dizaj SM. Safety and Toxicity Issues of Therapeutically Used Nanoparticles from the Oral Route. *Biomed Res Int.* 2021 Oct 28;2021:9322282. doi: 10.1155/2021/9322282.

337. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
338. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principal recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2020;30(4):844-856. doi:10.1111/bpa.12832
339. Loureiro, L.V.M., Neder, L., Callegaro-Filho, D. et al. The immunohistochemical landscape of the VEGF family and its receptors in glioblastomas. *Surg Exp Pathol* 3, 9 (2020). <https://doi.org/10.1186/s42047-020-00060-5>
340. Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci.* 2006 Feb;89(2):515-23. doi: 10.1093/toxsci/kfj031
341. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 2020 May;77(9):1745-1770. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.
342. Lugowska I, Misale S, Califano R, Haanen J. *Esmo handbook of targeted therapies and precision oncology.* Switzerland. 2022. ESMO Press. ISBN: 978-88-944465-5-5
343. Luissint, AC., Artus, C., Glacial, F. et al. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9, 23 (2012). <https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-23>
344. Lun M, Lok E, Gautam S, Wu E, Wong ET. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011 Nov;105(2):261-73. doi: 10.1007/s11060-011-0575-8
345. MacDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K (May 2008). "Blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound and circulating preformed microbubbles appears to be characterized by the mechanical index". *Ultrasound in Medicine & Biology.* 34 (5): 834–40. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.10.016.
346. Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release.* 2012 Dec 10;164(2):138-44. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.038
347. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3(3):1377–1397. doi:10.3390/polym3031377
348. Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, Osipova N, Razzhivina V, Arantseva D, et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm.* 2019 Dec 15; 572:118733. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733
349. Malinovskaya Y, Melnikov P, Baklaushev V, Gabashvili A, Osipova N, et al. Delivery of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles into U87 human glioblastoma cells. *Int J Pharm.* 2017 May 30;524(1-2):77-90. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.049
350. Mallick S., Giridhar P., Rath G. K. *Evidence based practice in Neuro-oncology* 2021 Springer. Singapore. 432. ISBN: 978-981-16-2658-6. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-2659-3>

351. Mandl HK, Quijano E, Suh HW, et al. Optimizing biodegradable nanoparticle size for tissue-specific delivery. *J Control Release*. 2019; 314:92-101. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.09.020
352. Manikandan C, Kaushik A, Sen D. Viral vector: potential therapeutic for glioblastoma multiforme. *Cancer Gene Ther*. 2020 May;27(5):270-279. doi: 10.1038/s41417-019-0124-8.
353. Manoranjan B, Provias JP. β -Catenin marks proliferating endothelial cells in glioblastoma. *J Clin Neurosci*. 2022 Feb 18; 98:203-206. doi: 10.1016/j.jocn.2022.02.018
354. Mansouri E, Jangaran A, Ashtari A. Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Bratisl Lek Listy*. 2017;118(5):273-277. doi: 10.4149/BLL_2017_054
355. Mantia C, Uhlmann EJ, Puligandla M, Weber GM, Neuberg D, Zwicker JJ. Predicting the higher rate of intracranial hemorrhage in glioma patients receiving therapeutic enoxaparin. *Blood*. 2017 Jun 22;129(25):3379-3385. doi: 10.1182/blood-2017-02-767285
356. Matcovschii V, Lisii D, Gudumac V, Dorosenco S. Selective interstitial doxorubicin for recurrent glioblastoma. *Clin Case Rep*. 2019 Nov 19;7(12):2520-2525. doi: 10.1002/ccr3.2546
357. Matsumoto H, Minami H, Tominaga S, Yoshida Y. Development of Glioblastoma after Treatment of Brain Abscess. *World Neurosurg*. 2016 Apr; 88:686.e19-686.e25. doi: 10.1016/j.wneu.2015.11.017
358. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2000 Jun;2(6):318-25. doi: 10.1038/35014006
359. Mattei V, Santilli F, Martellucci S, Delle Monache S, et al. The Importance of Tumor Stem Cells in Glioblastoma Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 8;22(8):3863. doi: 10.3390/ijms22083863
360. Matter K, Balda MS. Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *J Cell Biol*. 2003 May 12;161(3):459-60. doi: 10.1083/jcb.200304039.
361. Maurice-Dror C, Perets R, Bar-Sela G. Glucocorticoids as an adjunct to oncologic treatment in solid malignancies - Not an innocent bystander. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Jun; 126:37-44. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.03.015.
362. McCarthy M, Auda G, Agrawal S, Taylor A, et al. In vivo anticancer synergy mechanism of doxorubicin and verapamil combination treatment is impaired in BALB/c mice with metastatic breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 2014 Aug;97(1):6-15. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.04.013
363. McKeever PE. Insights about brain tumors gained through immunohistochemistry and in situ hybridization of nuclear and phenotypic markers. *J Histochem Cytochem*. 1998 May;46(5):585-94. doi: 10.1177/002215549804600504
364. Mehrian-Shai R, Reichardt JKV, Harris CC, Toren A. The Gut-Brain Axis, Paving the Way to Brain Cancer. *Trends Cancer*. 2019 Apr;5(4):200-207. doi: 10.1016/j.trecan.2019.02.008
365. Mehta AM, Sonabend AM, Bruce JN. Convection-Enhanced Delivery. *Neurotherapeutics*. 2017 Apr;14(2):358-371. doi: 10.1007/s13311-017-0520-4.

366. Mehta MP, Vogelbaum M, Chang S, Patel N. Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2011:1700–1749.
367. Meng Liang, Chunhong Gao, Yuli Wang, Wei Gong et al. Enhanced blood–brain barrier penetration and glioma therapy mediated by T7 peptide-modified low-density lipoprotein particles, *Drug Delivery*, (2018) 25:1, 1652-1663, doi:10.1080/10717544.2018.1494223
368. Mendelsohn AR, Larrick JW. Paradoxical effects of antioxidants on cancer. *Rejuvenation Res*. 2014 Jun;17(3):306-11. doi: 10.1089/rej.2014.1577
369. Mercier C, Declèves X, Masseguin C, Fragner P, et al. P-glycoprotein (ABCB1) but not multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) is induced by doxorubicin in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem*. 2003 Nov;87(4):820-30. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02034.x
370. Meric-Bernstam F, Mills GB. Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(9):542-548. doi:10.1038/nrclinonc.2012.127
371. Miccoli L, Oudard S, Sureau F, Poirson F, Dutrillaux B, Poupon MF. Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. *Biochem J*. 1996 Feb 1;313 (Pt 3) (Pt 3):957-62. doi: 10.1042/bj3130957.
372. Miraglia E, Viarisio D, Riganti C, Costamagna C, Ghigo D, Bosia A. Na⁺/H⁺ exchanger activity is increased in doxorubicin-resistant human colon cancer cells and its modulation modifies the sensitivity of the cells to doxorubicin. *Int J Cancer*. 2005 Jul 20;115(6):924-9. doi: 10.1002/ijc.20959
373. Mirzayans R, Murray D. Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 29;21(23):9090. doi: 10.3390/ijms21239090.
374. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MN. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release*. 2007;119(1):77-85. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.01.016
375. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, et al. Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor with Survival Within Molecular Subgroups of Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma [published correction appears in *JAMA Oncol*. 2020 Mar 1;6(3):444]. *JAMA Oncol*. 2020;6(4):495-503. doi:10.1001/jamaoncol.2019.6143
376. Morbidelli L. *Antiangiogenic Drugs as Chemosensitizers in Cancer Therapy*, Academic Press, Volume 18, ISBN: 9780323901901 PUB DATE: Jan 15, 2022
377. Morbidelli L. In *Cancer Sensitizing Agents for Chemotherapy*. Chapter 9 -, Editor(s): Morbidelli L., 2022, Pages 147-197, ISSN 24683183, ISBN 9780323901901, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90190-1.00014-7>.
378. Mosieniak G, Sliwinska MA, Alster O, Strzeszewska A, Sunderland P, Piechota M, Was H, Sikora E. Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence. *Neoplasia*. 2015 Dec;17(12):882-893. doi: 10.1016/j.neo.2015.11.008.

379. Mostafa RE, Morsi AH, Asaad GF. Anti-inflammatory effects of saxagliptin and vildagliptin against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: attenuation of NLRP3 inflammasome up-regulation and tubulo-interstitial injury. *Res Pharm Sci.* 2021 Aug 19;16(5):547-558. doi: 10.4103/1735-5362.323920
380. Moussavian, S. N.; Becker, R. C.; Piepmeyer, J. L.; Mezey, E.; Bozian, R. C. (Mar 1985). "Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism. Influence of alcohol ingestion and liver disease". *Digestive Diseases and Sciences.* 30 (3): 211–4. doi:10.1007/bf01347885
381. Mu P, Zhang Z, Benelli M, Karthaus WR, Hoover E, Chen CC, Wongvipat J, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and RB1-deficient prostate cancer. *Science.* 2017 Jan 6;355(6320):84-88. doi: 10.1126/science. aah4307.
382. Mudd TW, Guddati AK. Management of hepatotoxicity of chemotherapy and targeted agents. *Am J Cancer Res.* 2021 Jul 15;11(7):3461-3474
383. Nabors LB, Portnow J, Ahluwalia M, et al. Central Nervous System Cancers, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020;18(11):1537-1570. Published 2020 Nov 2. doi:10.6004/jnccn.2020.0052
384. Naumenko V, Nikitin A, Kapitanova K, Melnikov P, Vodopyanov S, Garanina A, et al. Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney. *J Control Release.* 2019 Aug 10; 307:368-378. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.026
385. NCT04619056 ClinicalTrials.gov Identifier: First-in-man Clinical Trial of CEB-01 PLGA Membrane in Recurrent or Locally Advanced Retroperitoneal Soft Tissue Sarcoma November 6, 2020
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04619056?term=PLGA&draw=2&rank=8>
386. NCT04751786 Escalation Study of Immunomodulatory Nanoparticles (PRECIOUS-01)
387. Nduom EK, Bouras A, Kaluzova M, Hadjipanayis CG. Nanotechnology applications for glioblastoma. *Neurosurg Clin N Am.* 2012;23(3):439-449. doi: 10.1016/j.nec.2012.04.006
388. Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, et al. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol.* 2008;7(1):84-96. doi:10.1016/S1474-4422(07)70326-5
389. Nikitin PV, Ryzhova MV, Zubova IV, Panina TN, Shugay SV. Geterogenost' opukholevykh kletok v glioblastomakh [Heterogeneity of tumor cells in glioblastomas]. *Arkh Patol.* 2019;81(3):27-36. Russian. doi: 10.17116/patol20198103127
390. Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci.* 2010;112(2):251-254. doi:10.1254/jphs.09292sc
391. Norouzi M, Firouzi J, Sodeifi N, Ebrahimi M, Miller DW. Salinomycin-loaded injectable thermosensitive hydrogels for glioblastoma therapy. *Int J Pharm.* 2021 Apr 1; 598:120316. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120316.
392. Norouzi, M., Yathindranath, V., Thliveris, J.A. et al. Doxorubicin-loaded iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy: a combinational approach for enhanced delivery of nanoparticles. *Sci Rep* 10, 11292 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68017-y>

393. Norton ES, Whaley LA, Ulloa-Navas MJ, García-Tárraga P, et al. Glioblastoma disrupts the ependymal wall and extracellular matrix structures of the subventricular zone. *Fluids Barriers CNS*. 2022 Jul 11;19(1):58. doi: 10.1186/s12987-022-00354-8.
394. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, Catane R, et al. CAELYX Breast Cancer Study Group. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2004 Mar;15(3):440-9. doi: 10.1093/annonc/mdh097.
395. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, et al. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J Transl Med*. 2014; 12:107. Published 2014 Apr 29. doi:10.1186/1479-5876-12-107
396. Ohtsuki S. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(10):1489-1496. doi:10.1248/bpb.27.1489
397. Oklinski MK, Skowronski MT, Skowronska A, Rützler M, Nørgaard K, Nieland JD, Kwon TH, Nielsen S. Aquaporins in the Spinal Cord. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 7;17(12):2050. doi: 10.3390/ijms17122050.
398. Okolie O, Bago JR, Schmid RS, Irvin DM, Bash RE, Miller CR, Hingtgen SD. Reactive astrocytes potentiate tumor aggressiveness in a murine glioma resection and recurrence model. *Neuro Oncol*. 2016 Dec;18(12):1622-1633. doi: 10.1093/neuonc/nov117.
399. Ongnok B, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Doxorubicin and cisplatin induced cognitive impairment: The possible mechanisms and interventions. *Exp Neurol*. 2020 Feb; 324:113118. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113118.
400. Ostrom QT, Cote DJ, Ascha M, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Adult Glioma Incidence and Survival by Race or Ethnicity in the United States From 2000 to 2014. *JAMA Oncol*. 2018;4(9):1254-1262. doi:10.1001/jamaoncol.2018.1789
401. Padovan M., Maccari M., Bosio A., Vizzaccaro S., et al. Next-generation sequencing (NGS) for identifying actionable molecular alterations in patients with newly diagnosed and recurrent IDHwt-glioblastoma (GBM): A large mono-institutional experience. *Journal of Clinical Oncology* 2022 40:16_suppl, 3139-3139
402. Palko N.N., Potemkin V.A., Grishina M.A. Decision tree for mechanism of antitumor drugs action prediction // Вестник ЮУрГУ. Серия: Химия. 2019. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/decision-tree-for-mechanism-of-antitumor-drugs-action-prediction>
403. Palpan Flores A, Vivancos Sanchez C, Roda JM, Cerdán S, Barrios AJ, Utrilla C, et al. Assessment of Pre-operative Measurements of Tumor Size by MRI Methods as Survival Predictors in Wild Type IDH Glioblastoma. *Front Oncol*. 2020 Sep 2; 10:1662. doi: 10.3389/fonc.2020.01662.
404. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005;2(1):3-14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
405. Pardridge WM. Vector-mediated drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;36(2-3):299-321. doi:10.1016/s0169-409x(98)00087-8

406. Park JH, Han J, Lee M. Thymidine kinase gene delivery using curcumin loaded peptide micelles as a combination therapy for glioblastoma. *Pharm Res.* 2015 Feb;32(2):528-37. doi: 10.1007/s11095-014-1482-4.
407. Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002;4(3):95-9. doi: 10.1186/bcr432
408. Paterson DI, Wiebe N, Cheung WY, Mackey JR, Pituskin E, Reiman A, Tonelli M. Incident Cardiovascular Disease Among Adults with Cancer: A Population-Based Cohort Study. *JACC CardioOncol.* 2022 Mar 15;4(1):85-94. doi: 10.1016/j.jacc.2022.01.100
409. Pati S, Verma R, Akbari H, et al. Reproducibility analysis of multi-institutional paired expert annotations and radiomic features of the Ivy Glioblastoma Atlas Project (Ivy GAP) dataset. *Med Phys.* 2020;47(12):6039-6052. doi:10.1002/mp.14556
410. Pavelka M., J. Roth. Funktionelle Ultrastruktur: Atlas of Tissue Biology and Pathology. — Verlag Springer. 2010 — C. 234–235. — ISBN 3-211-83563-6.
411. Pavlyukov MS, Yu H, Bastola S, Minata M, Shender VO, Lee Y, Zhang S, Wang J, et al. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer Cell.* 2018 Jul 9;34(1):119-135.e10. doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.012.
412. Peiffer J, Kleihues P. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol.* 1999 Apr;9(2):241-5. doi: 10.1111/j.1750-3639.1999.tb00222.x.
413. Pelosof LC, Gerber DE. Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2010 Sep;85(9):838-54. doi: 10.4065/mcp.2010.0099.
414. Pereverzeva E, Treschalin I, Treschalin M, Arantseva D, Ermolenko Y, Kumskova N, Maksimenko O, Balabanyan V, Kreuter J, Gelperina S. Toxicological study of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *Int J Pharm.* 2019 Jan 10; 554:161-178. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.014.
415. Petri B, Bootz A, Khalansky A, et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J Control Release.* 2007;117(1):51-58. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.10.015
416. Pibuel MA, Poodts D, Díaz M, Hajos SE, Lomparía SL. The scrambled story between hyaluronan and glioblastoma. *J Biol Chem.* 2021 Jan-Jun; 296:100549. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100549.
417. Pineda B, Sánchez García FJ, Olascoaga NK, Pérez de la Cruz V, et al. Malignant Glioma Therapy by Vaccination with Irradiated C6 Cell-Derived Microvesicles Promotes an Antitumoral Immune Response. *Mol Ther.* 2019 Sep 4;27(9):1612-1620. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.05.016.
418. Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol.* 2004 Nov;56(5):715-9. doi: 10.1002/ana.20269
419. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):437-43. doi: 10.1038/nature04871

420. Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci.* 2020 Jun 1; 250:117599. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117599
421. Provenzale JM, Silva GA. Uses of nanoparticles for central nervous system imaging and therapy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(7):1293-1301. doi:10.3174/ajnr. A1590
422. Pruss M, Dwucet A, Tanriover M, Hlavac M, Kast RE, et al. Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma. *Br J Cancer.* 2020 Apr;122(8):1146-1157. doi: 10.1038/s41416-020-0759-0
423. Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, Jacob JA, Karuppusamy I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci.* 2018 May 1; 200:26-30. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.023.
424. Pustchi SE, Avci NG, Akay YM, Akay M. Astrocytes Decreased the Sensitivity of Glioblastoma Cells to Temozolomide and Bay 11-7082. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 28;21(19):7154. doi: 10.3390/ijms21197154.
425. Putney LK, Barber DL. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J Biol Chem.* 2003 Nov 7;278(45):44645-9. doi: 10.1074/jbc.M308099200
426. Qiao X, van der Zanden SY, Wander DPA, et al. Uncoupling DNA damage from chromatin damage to detoxify doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jun 30;117(26):15182-15192. doi: 10.1073/pnas.1922072117.
427. Qin D, Wang J, Le A, Wang TJ, Chen X, Wang J. Traumatic Brain Injury: Ultrastructural Features in Neuronal Ferroptosis, Glial Cell Activation and Polarization, and Blood-Brain Barrier Breakdown. *Cells.* 2021;10(5):1009. Published 2021 Apr 24. doi:10.3390/cells10051009
428. Qin Y, Guo T, Wang Z, Zhao Y. The role of iron in doxorubicin-induced cardiotoxicity: recent advances and implication for drug delivery. *J Mater Chem B.* 2021 Jun 23;9(24):4793-4803. doi: 10.1039/d1tb00551k
429. Rabkin CS, Janz S, Lash A, Coleman AE, et al. Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. *N Engl J Med.* 1997 Apr 3;336(14):988-93. doi: 10.1056/NEJM199704033361403
430. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, Wei G, Lamba G, Liu D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp Hematol Oncol.* 2012 Apr 23;1(1):10. doi: 10.1186/2162-3619-1-10
431. Ratain MJ, Rowley JD. Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II: from the bedside to the target genes. *Ann Oncol.* 1992 Feb;3(2):107-11. doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a058121.
432. Ratajczak MZ, Bujko K, Mack A, Kucia M, Ratajczak J. Cancer from the perspective of stem cells and misappropriated tissue regeneration mechanisms. *Leukemia.* 2018 Dec;32(12):2519-2526. doi: 10.1038/s41375-018-0294-7
433. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for

- effective management. *Biomed Pharmacother.* 2021; 139:111708. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111708
434. Reed MJ, Damodarasamy M, Banks WA. The extracellular matrix of the blood-brain barrier: structural and functional roles in health, aging, and Alzheimer's disease. *Tissue Barriers.* 2019;7(4):1651157. doi:10.1080/21688370.2019.1651157
435. Reno TA, Tong SW, Wu J, Fidler JM, Nelson R, Kim JY, Raz DJ. The triptolide derivative MRx102 inhibits Wnt pathway activation and has potent anti-tumor effects in lung cancer. *BMC Cancer.* 2016 Jul 11; 16:439. doi: 10.1186/s12885-016-2487-7.
436. Robert NJ, Vogel CL, Henderson IC, Sparano JA, et al. The role of the liposomal anthracyclines and other systemic therapies in the management of advanced breast cancer. *Semin Oncol.* 2004 Dec;31(6 Suppl 13):106-46. doi: 10.1053/j.seminoncol.2004.09.018
437. Roberts WK, Darnell RB. Neuroimmunology of the paraneoplastic neurological degenerations. *Curr Opin Immunol.* 2004 Oct;16(5):616-22. doi: 10.1016/j.coi.2004.07.009
438. Roland CL, Arumugam T, Deng D, et al. Cell surface lactate receptor GPR81 is crucial for cancer cell survival. *Cancer Res.* 2014 Sep 15;74(18):5301-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0319.
439. Romeo HE, Tio DL, Rahman SU, Chiappelli F, Taylor AN. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J Neuroimmunol.* 2001;115(1-2):91-100. doi:10.1016/s0165-5728(01)00270-3
440. Rosen J, Blau T, Grau SJ, Barbe MT, Fink GR, Galldiks N. Extracranial Metastases of a Cerebral Glioblastoma: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Oncol.* 2018 Aug 28;11(2):591-600. doi: 10.1159/000492111
441. Rosenblum D, Gutkin A, Kedmi R, Ramishetti S, Veiga N, et al. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. *Sci Adv.* 2020 Nov 18;6(47):eabc9450. doi: 10.1126/sciadv.abc9450
442. Roumane A., Berthenet, K., El Fassi, C. et al. Caspase-independent cell death does not elicit a proliferative response in melanoma cancer cells. *BMC Cell Biol* 19, 11 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12860-018-0164-1>
443. Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull.* 2000;51(5):363-369. doi:10.1016/s0361-9230(99)00260-9
444. Rutledge WC, Kong J, Gao J, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma are associated with specific genomic alterations and related to transcriptional class. *Clin Cancer Res.* 2013;19(18):4951-4960. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0551
445. Sabel B., Kreuter J., Gelperina S. Medinova Pat. WO 007/74658 A1. IPC: A61K 9/51, C08B 3/06. Use of drug-loaded nanoparticles for the treatment of cancers / Medical Consulting (DE)- № PCT/EP99/03838, filed 02.06.1999, publ. date 14.12.2000
446. Mirakabad S.T.F., Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(2):517-35. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.2.517.

447. Said R., Nickolich M., Lenihan D.J., Tsimberidou A.M. (2017) Cardiotoxicity of Anticancer Therapies. In: Kimmick G., Lenihan D., Sawyer D., Mayer E., Hershman D. (eds) Cardio-Oncology. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-43096-6_2
448. Salimi M, Sarkar S, Fathi S, Alizadeh AM, Saber R, Moradi F, Delavari H. Biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity of dendrimer-coated iron oxide nanoparticles in BALB/c mice. *Int J Nanomedicine*. 2018 Mar 13; 13:1483-1493. doi: 10.2147/IJN.S157293
449. Salmina K, Bojko A, Inashkina I, Staniak K, Dudkowska M, Podlesniy P, Rumnieks F, et al. "Mitotic Slippage" and Extranuclear DNA in Cancer Chemoresistance: A Focus on Telomeres. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 16;21(8):2779. doi: 10.3390/ijms21082779.
450. Salmina K, Gerashchenko BI, Hausmann M, Vainshelbaum NM, Zayakin P, Erenpreiss J, Freivalds T, Cragg MS, Erenpreisa J. When Three Isn't a Crowd: A Digyny Concept for Treatment-Resistant, Near-Triploid Human Cancers. *Genes (Basel)*. 2019 Jul 19;10(7):551. doi: 10.3390/genes10070551
451. Sanajou D, Nazari Soltan Ahmad S, Hosseini V, et al. β -Lapachone protects against doxorubicin-induced nephrotoxicity via NAD⁺ /AMPK/NF- κ B in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2019 May;392(5):633-640. doi:10.1007/s00210-019-01619-0.
452. Sanna V, Roggio AM, Siliani S, et al. Development of novel cationic chitosan- and anionic alginate-coated poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:5501–5516. doi:10.2147/IJN.S36684
453. Santacroce L, Diomede L, Balducci L (2019-02-03). Talavera F, Movsas B (eds.). "Background of Paraneoplastic Syndromes". Medscape. WebMD LLC.
454. Santos-Alves E, Rizo-Roca D, Marques-Aleixo I, Coxito P, Martins S, et al. Physical exercise positively modulates DOX-induced hepatic oxidative stress, mitochondrial dysfunction and quality control signaling. *Mitochondrion*. 2019 Jul; 47:103-113. doi: 10.1016/j.mito.2019.05.008
455. Sardiña González C, Martínez Vivero C, López Castro J. Paraneoplastic syndromes review: The great forgotten ones. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2022 Jun; 174:103676. doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103676
456. Schapira AH (2007). *Neurology and clinical neuroscience*. Philadelphia: Mosby Elsevier. p. 1336. ISBN 978-0323070539.
457. Scherer H. J. Structural Development in Gliomas. 1938. *The American Journal of Cancer* (1938) 34 (3): 333–351. <https://doi.org/10.1158/ajc.1938.333>
458. Scheurer ME, Etzel CJ, Liu M, Barnholtz-Sloan J, Wiklund F, et al. GLIOGENE Consortium. Familial aggregation of glioma: a pooled analysis. *Am J Epidemiol*. 2010 Nov 15;172(10):1099-107. doi: 10.1093/aje/kwq261
459. Schneider T, Becker A, Ringe K, Reinhold A, Firsching R, Sabel BA. Brain tumor therapy by combined vaccination and antisense oligonucleotide delivery with nanoparticles. *J Neuroimmunol*. 2008;195(1-2):21-27. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.12.005
460. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348(6230):69-74. doi:10.1126/science.aaa4971

461. Segura-Collar B, Garranzo-Asensio M, Herranz B, Hernández-SanMiguel E, Cejalvo T, et al. Tumor-Derived Pericytes Driven by EGFR Mutations Govern the Vascular and Immune Microenvironment of Gliomas. *Cancer Res.* 2021 Apr 15;81(8):2142-2156. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3558.
462. Seker-Polat F, Pinarbasi Degirmenci N, Solaroglu I, Bagci-Onder T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 17;14(2):443. doi: 10.3390/cancers14020443
463. Seko, I. (2020). Brain-targeted nanoparticles to overcome the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Technology*, 1 (1), 25-39. DOI: 10.37662/jpt.2020.4
464. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer-the New Testament. *Open Biol.* 2021 Jan;11(1):200358. doi: 10.1098/rsob.200358.
465. Shabana AM, Xu B, Schneiderman Z, Ma J, Chen CC, Kokkoli E. Targeted Liposomes Encapsulating miR-603 Complexes Enhance Radiation Sensitivity of Patient-Derived Glioblastoma Stem-Like Cells. *Pharmaceutics.* 2021 Jul 21;13(8):1115. doi: 10.3390/pharmaceutics13081115
466. Shalviri A, Raval G, Prasad P, Chan C, Liu Q, Heerklotz H, Rauth AM, Wu XY. pH-Dependent doxorubicin release from terpolymer of starch, polymethacrylic acid and polysorbate 80 nanoparticles for overcoming multi-drug resistance in human breast cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012 Nov;82(3):587-97. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.09.001.
467. Shen X, Wang H, Weng C, Jiang H, Chen J. Caspase 3/GSDME-dependent pyroptosis contributes to chemotherapy drug-induced nephrotoxicity. *Cell Death Dis.* 2021 Feb 15;12(2):186. doi: 10.1038/s41419-021-03458-5.
468. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993;7(11):1031-1038. doi:10.1096/fasebj.7.11.8370472
469. Shields CW 4th, Evans MA, Wang LL, et al. Cellular backpacks for macrophage immunotherapy. *Sci Adv.* 2020 Apr 29;6(18): eaaz6579. doi: 10.1126/sciadv.aaz6579
470. Shin GY, Shim JK, Lee JH, Shin HJ, Lee SJ, Huh YM, Kim EH, Park EK, et al. Changes in the biological characteristics of glioma cancer stem cells after serial in vivo subtransplantation. *Childs Nerv Syst.* 2013 Jan;29(1):55-64. doi: 10.1007/s00381-012-1963-x.
471. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int.* 2012 Sep;19(3):241-4. doi: 10.4103/0971-6580.103656
472. Shokrzadeh M, Bagheri A, Ghassemi-Barghi N, Rahmanian N, Eskandani M. Doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoliposome induce senescence by enhancing oxidative stress, hepatotoxicity, and in vivo genotoxicity in male Wistar rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2021 Aug;394(8):1803-1813. doi: 10.1007/s00210-021-02119-w
473. Shuvaev A.N., N.V. Kuvacheva, A.V. Morgun, E.D. et al. The Role of Ion Channels Expressed in Cerebral Endothelial Cells in the Functional Integrity of the Blood-Brain Barrier (Review) // *Соврем. технол. мед.* 2016. №4 (eng). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/the-role-of-ion-channels-expressed-in-cerebral-endothelial-cells-in-the-functional-integrity-of-the-blood-brain-barrier-review>

474. Si W, Shen J, Zheng H, Fan W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin Epigenetics*. 2019 Feb 11;11(1):25. doi: 10.1186/s13148-018-0587-8
475. Simonds EF, Lu ED, Badillo O, Karimi S, Liu EV, T et al. Deep immune profiling reveals targetable mechanisms of immune evasion in immune checkpoint inhibitor-refractory glioblastoma. *J Immunother Cancer*. 2021 Jun;9(6): e002181. doi: 10.1136/jitc-2020-002181.
476. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):396-401. doi: 10.1038/nature03128
477. Sinha BK. Role of Oxygen and Nitrogen Radicals in the Mechanism of Anticancer Drug Cytotoxicity. *J Cancer Sci Ther*. 2020;12(1):10-18.
478. Skopelja-Gardner S, Tai J, Sun X, et al. Acute skin exposure to ultraviolet light triggers neutrophil-mediated kidney inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jan 19;118(3): e2019097118. doi: 10.1073/pnas.2019097118.
479. Slegers RJ, Bouwens van der Vlis TAM, Ackermans L, Hoeben A, Postma AA, et al. Myasthenia gravis after glioblastoma resection: paraneoplastic syndrome or coincidence? A unique case report and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)*. 2022 Feb;164(2):423-427. doi: 10.1007/s00701-021-05035-3.
480. Sliwinska M.A., Mosieniak G., Wolanin K., Babik A., Piwocka K., Magalska A., et al. Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech. Ageing Dev*. 2009; 130:24–32. doi: 10.1016/j.mad.2008.04.011.
481. Smirnova Z.S., Gerasimova G.K., Rodionova J.V. et al. Effect of new antitumor drugs on transplantable glioblastoma of rats. //Abstr. VII international congress on anticancer treatment. Febr. 3-6-th, Paris, France.1997.-N P323.-P.206.
482. Smuder AJ. Exercise stimulates beneficial adaptations to diminish doxorubicin-induced cellular toxicity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2019 Nov 1;317(5): R662-R672. doi: 10.1152/ajpregu.00161.2019.
483. Soloman R, Gabizon AA. Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008;8(1):21-32. doi:10.3816/clm.2008.n.001
484. Soltani Hekmat A, Chenari A, Alipanah H, Javanmardi K. Protective effect of alamandine on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2021 May 29;22(1):31. doi: 10.1186/s40360-021-00494-x
485. Sonar SA, Lal G. Blood-brain barrier and its function during inflammation and autoimmunity. *J Leukoc Biol*. 2018;103(5):839-853. doi:10.1002/JLB.1RU1117-428R
486. Spindler LM, Feuerhake A, Ladel S, et al. Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa. *Front Pharmacol*. 2021; 12:732954. Published 2021 Sep 1. doi:10.3389/fphar.2021.732954
487. Stan AC, Casares S, Radu D, Walter GF, Brumeanu TD. Doxorubicin-induced cell death in highly invasive human gliomas. *Anticancer Res*. 1999;19(2A):941-950.

488. Steiniger SC, Kreuter J, Khalansky AS, Skidan IN, Bobruskin AI, Smirnova ZS, et al. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int J Cancer*. 2004 May 1;109(5):759-67. doi: 10.1002/ijc.20048.
489. Stepanenko AA, Chekhonin VP. Recent Advances in Oncolytic Virotherapy and Immunotherapy for Glioblastoma: A Glimmer of Hope in the Search for an Effective Therapy? *Cancers (Basel)*. 2018 Dec 5;10(12):492. doi: 10.3390/cancers10120492
490. Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res*. 1987;47(22):5846-5852.
491. Strojnik T, Duh D, Lah TT. Prevalence of Neurotropic Viruses in Malignant Glioma and Their Onco-Modulatory Potential. *In Vivo*. 2017 Mar-Apr;31(2):221-229. doi: 10.21873/invivo.11049.
492. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, Kirson ED, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*. 2012 Sep;48(14):2192-202. doi: 10.1016/j.ejca.2012.04.011
493. Stylianopoulos T. Intelligent drug delivery systems for the treatment of solid tumors. *Eur. J. Nanomed*. 2016; 8(1): 9–16. DOI 10.1515/ejnm-2015-0041
494. Sumi N, Nishioku T, Takata F, et al. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(2):247-253. doi:10.1007/s10571-009-9446-7
495. Sun X, Xu C, Wu G, Ye Q, Wang C. Poly (Lactic-co-Glycolic Acid): Applications and Future Prospects for Periodontal Tissue Regeneration. *Polymers (Basel)*. 2017;9(6):189. Published 2017 Jun 1. doi:10.3390/polym9060189
496. Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*. 2016;19(6):771-783. doi:10.1038/nn.4288
497. Symon Z, Peyser A, Tzemach D, et al. Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes. *Cancer*. 1999;86(1):72-78.
498. Taguchi E, Horiuchi K, Senoo A, Susa M, Inoue M, Ishizaka T, Rikitake H, Matsuhashi Y, Chiba K. Eribulin induces tumor vascular remodeling through intussusceptive angiogenesis in a sarcoma xenograft model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Sep 17; 570:89-95. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.07.033.
499. Taha MS, Almsned FM, Hassen MA, Atean IM, et al. Demographic and histopathological patterns of neuro-epithelial brain tumors in Eastern Province of Saudi Arabia. *Neurosciences (Riyadh)*. 2018 Jan;23(1):18-22. doi: 10.17712/nsj.2018.1.20160543.
500. Takakura Y, Audus KL, Borchardt RT. Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. *Adv Pharmacol*. 1991; 22:137-165. doi:10.1016/s1054-3589(08)60034-4

501. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49(5):330-352. doi:10.1016/j.pcad.2006.10.002
502. Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev.* 2012;248(1):228-239. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x
503. Tang L, Su C, Chen Y, et al. Influence of biodegradable polybutylene succinate and non-biodegradable polyvinyl chloride microplastics on anammox sludge: Performance evaluation, suppression effect and metagenomic analysis. *J Hazard Mater.* 2021; 401:123337. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123337
504. Taylor MA, Das BC, Ray SK. Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma. *Apoptosis.* 2018 Dec;23(11-12):563-575. doi: 10.1007/s10495-018-1480-9.
505. Tenny S, Thorell W. Cerebral Salt Wasting Syndrome. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 29, 2022.*
506. Tetsuka S, Tominaga K, Ohta E, Kuroiwa K, Sakashita E, Kasashima K, Hamamoto T, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with an onconeural antibody against creatine kinase, brain-type. *J Neurol Sci.* 2013 Dec 15;335(1-2):48-57. doi: 10.1016/j.jns.2013.08.022.
507. Thakur M, Evans B, Schindewolf M, Baumgartner I, Döring Y. Neutrophil Extracellular Traps Affecting Cardiovascular Health in Infectious and Inflammatory Diseases. *Cells.* 2021 Jul 4;10(7):1689. doi: 10.3390/cells10071689.
508. Thomas SA, Abbruscato TJ, Hruba VJ, Davis TP. The entry of [D-penicillamine_{2,5}] enkephalin into the central nervous system: saturation kinetics and specificity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Mar;280(3):1235-40.
509. Thomsen MS, Johnsen KB, Kucharz K, Lauritzen M, Moos T. Blood-Brain Barrier Transport of Transferrin Receptor-Targeted Nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2022;14(10):2237. Published 2022 Oct 19. doi:10.3390/pharmaceutics14102237
510. Tietjen GT, Hosgood SA, DiRito J, Cui J, Deep D, Song E, Kraehling JR, et al. Nanoparticle targeting to the endothelium during normothermic machine perfusion of human kidneys. *Sci Transl Med.* 2017 Nov 29;9(418): eaam6764. doi: 10.1126/scitranslmed. aam6764
511. Tietz S., Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J. Cell Biol.* 2015; 209:493–506. doi: 10.1083/jcb.201412147.
512. Tosoni A, Franceschi E, Brandes AA. Chemotherapy in breast cancer patients with brain metastases: have new chemotherapeutic agents changed the clinical outcome? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 Dec;68(3):212-21. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.04.004. Epub 2008 Jun 12 URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29931>
513. Trone JC, Vallard A, Sotton S, Ben Mrad M, Wojnowski. Survival after hypofractionation in glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Radiat Oncol.* 2020 Jun 8;15(1):145. doi:10.1186/s13014-020-01584-6.

514. Uemura A., Fruttige rM., D'Amore P.A., FalcoS. et al. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation, *Progress in Retinal and Eye Research*, Volume 84, 2021, 100954, ISSN 1350-9462, <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100954>
515. van Ramshorst MS, van der Voort A, van Werkhoven ED, Mandjes IA, et al.; Dutch Breast Cancer Research Group (BOOG). Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Dec;19(12):1630-1640. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30570-9
516. Vert M, Doi Y, Hellwich K, Hess M, Hodge P, Kubisa P, Rinaudo M, Schué F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry.* 2012;84(2): 377-410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>
517. Vienne-Jumeau A, Tafani C, Ricard D. Environmental risk factors of primary brain tumors: A review. *Rev Neurol (Paris).* 2019 Dec;175(10):664-678. doi: 10.1016/j.neurol.2019.08.004
518. Vilas AP, Fiúza T. Dermatomiosite clássica//amiopática [Classic/amyopathic dermatomyositis]. *Acta Med Port.* 2000;13(5-6):287-294.
519. Voigt J, Christensen J, Shastri VP. Differential uptake of nanoparticles by endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Feb 25;111(8):2942-7. doi: 10.1073/pnas.1322356111
520. Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2020 Mar 27;126(7):926-941. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314681.
521. Walter KA, Tamargo RJ, Olivi A, Burger PC, Brem H. Intratumoral chemotherapy. *Neurosurgery.* 1995;37(6):1128-1145.
522. Wang X, Teng Z, Wang H, Wang C, Liu Y, Tang Y, Wu J, Sun J, Wang H, Wang J, Lu G. Increasing the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer MCF-7 cells with multidrug resistance using a mesoporous silica nanoparticle drug delivery system. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Mar 15;7(4):1337-47.
523. Ward C, Meehan J, Gray ME, Murray AF, Argyle DJ, Kunkler IH, et al. The impact of tumour pH on cancer progression: strategies for clinical intervention. *Explor Target Antitumor Ther.* 2020; 1:71-100. <https://doi.org/10.37349/etat.2020.00005>
524. Weinstock MJ, Uhlmann EJ, Zwicker JI. Intracranial hemorrhage in cancer patients treated with anticoagulation. *Thromb Res.* 2016 Apr;140 Suppl 1: S60-5. doi: 10.1016/S0049-3848(16)30100-1
525. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(4):842-857. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.10.022
526. Weller M, Le Rhun E, Preusser M, Tonn JC, Roth P. How we treat glioblastoma. *ESMO Open.* 2019 Jun 17;4(Suppl 2): e000520. doi: 10.1136/esmooopen-2019-000520.
527. Weller M, Le Rhun E. How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma? *Cancer Treat Rev.* 2020 Jul; 87:102029. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102029.

528. Wenger A, Carén H. Methylation Profiling in Diffuse Gliomas: Diagnostic Value and Considerations. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 18;14(22):5679. doi: 10.3390/cancers14225679.
529. Wesseling P, van der Laak JA, de Leeuw H, Ruiter DJ, Burger PC. Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections. *J Neurosurg*. 1994 Dec;81(6):902-9. doi: 10.3171/jns.1994.81.6.0902.
530. White-Gilbertson S, Voelkel-Johnson C. Giants and monsters: unexpected characters in the story of cancer recurrence. *Adv Cancer Res*. 2020; 148:201-232. doi: 10.1016/bs.acr.2020.03.001
531. Wilhelm S, Tavares, A. J.; Dai Q.; Ohta, S.; Audet J.; Dvorak H. F.; Chan W. C. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // *Nat. Rev. Mater*. 2016. Vol. 1, № 5. P. 16014.DOI: 10.1038/natrevmats.2016.14
532. Williams RM, Shah J, Tian HS, Chen X, Geissmann F, Jaimes EA, Heller DA. Selective Nanoparticle Targeting of the Renal Tubules. *Hypertension*. 2018 Jan;71(1):87-94. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09843
533. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*. 2011;14(11):1398-1405. Published 2011 Oct 26. doi:10.1038/nn.2946
534. Wiwatchaitawee K, Quarterman JC, Geary SM, Salem AK. Enhancement of Therapies for Glioblastoma (GBM) Using Nanoparticle-based Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech*. 2021 Feb 11;22(2):71. doi: 10.1208/s12249-021-01928-9.
535. Wohlfart S, Khalansky AS, Gelperina S, Maksimenko O, Bernreuther C, Glatzel M, Kreuter J. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PLoS One*. 2011 May 6;6(5): e19121. doi: 10.1371/journal.pone.0019121.
536. Wohlfart S., Bernreuther C., Khalansky A.S., Theisen A., Weissenberger J., Gelperina S., Glatzel M., Kreuter J. Increased numbers of injections of doxorubicin bound to nanoparticles lead to enhanced efficacy against rat glioblastoma 101/8. // *J. Nanoneuroscience*, 2009, 1, 144–151.
537. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlüter G, Schmidt A, et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*. 2005 Dec 13;112(24):3754-62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576850.
538. Won H. J.; Ryplida, B.; Kim, S. G.; Lee, G.; et al. Diselenide-Bridged Carbon-Dot-Mediated Self-Healing, Conductive, and Adhesive Wireless Hydrogel Sensors for Label-Free Breast Cancer Detection. *ACS Nano* 2020, 14, 8409– 8420, DOI: 10.1021/acsnano.0c02517
539. Wong E, Nahar N, Hau E, Varikatt W, Gebiski V, Ng T, Jayamohan J, Sundaresan P. Cut-point for Ki-67 proliferation index as a prognostic marker for glioblastoma. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2019 Feb;15(1):5-9. doi: 10.1111/ajco.12826.
540. Wu BB, Leung KT, Poon EN. Mitochondrial-Targeted Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 9;23(3):1912. doi: 10.3390/ijms23031912

541. Wu T, Wang X, Zhang R, et al. Mice with pre-existing tumors are vulnerable to postoperative cognitive dysfunction. *Brain Res.* 2020; 1732:146650. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146650
542. Wu X, Yin C, Ma J, Chai S, Zhang C, et al. Polyoxypregnanes as safe, potent, and specific ABCB1-inhibitory pro-drugs to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy in vitro and in vivo. *Acta Pharm Sin B.* 2021 Jul;11(7):1885-1902. doi: 10.1016/j.apsb.2020.12.021.
543. Xiang C, Yan Y, Zhang D. Alleviation of the doxorubicin-induced nephrotoxicity by fasudil in vivo and in vitro. *J Pharmacol Sci.* 2021 Jan;145(1):6-15. doi: 10.1016/j.jphs.2020.10.002
544. Xing Y, Chaudry Q, Shen C, et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1152-1165. doi:10.1038/nprot.2007.107
545. Xu H, Chen J, Xu H, Qin Z. Geographic Variations in the Incidence of Glioblastoma and Prognostic Factors Predictive of Overall Survival in US Adults from 2004-2013. *Front Aging Neurosci.* 2017 Nov 7; 9:352. doi: 10.3389/fnagi.2017.00352.
546. Xue W, Liu Y, Zhang N, Yao Y, Ma P, Wen H, Huang S, Luo Y, Fan H. Effects of core size and PEG coating layer of iron oxide nanoparticles on the distribution and metabolism in mice. *Int J Nanomedicine.* 2018 Sep 25; 13:5719-5731. doi: 10.2147/IJN.S165451
547. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 2010 Oct 28;467(7319):1114-7. doi: 10.1038/nature09515
548. Yadav AK, Madan R, Chatterjee D, Dhiman S, et al. Small cell glioblastoma multiforme: a case series and clinicopathological update. *CNS Oncol.* 2020 Dec 1;9(4): CNS63. doi: 10.2217/cns-2020-0016.
549. Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem.* 2013;288(44):31761-31771. doi:10.1074/jbc.M113.514091
550. Yan H, Ramirez-Guerrero D, Lowengrub J, Wu M. Correction: Stress generation, relaxation and size control in confined tumor growth. *PLoS Comput Biol.* 2022 Jun 23;18(6): e1010288. doi: 10.1371/journal.pcbi.1010288
551. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015 Jun;38(6):364-74. doi: 10.1016/j.tins.2015.04.003.
552. Yashin K. S., Karabut M.M., Fedoseeva V.V., Khalansky A.S., Matveev L.A., Elagin V.V., Kuznetsov S.S., Kiseleva E. B., Kravets L.Ya., Medyanik I.A., Gladkova N.D. Multimodal optical coherence tomography as a method for visualizing glioblastomal brain tissue structure (experimental study). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 73–81, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.1.10>.
553. Yildiz T, Gu R, Zauscher S, Betancourt T. Doxorubicin-loaded protease-activated near-infrared fluorescent polymeric nanoparticles for imaging and therapy of cancer. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13:6961-6986. Published 2018 Oct 31. doi:10.2147/IJN.S174068

554. Yin S, Liu J, Kang Y, Lin Y, Li D, Shao L. Interactions of nanomaterials with ion channels and related mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2019 Oct;176(19):3754-3774. doi: 10.1111/bph.14792
555. Yoo KC, Kang JH, Choi MY, Suh Y, et al. Soluble ICAM-1 a Pivotal Communicator between Tumors and Macrophages, Promotes Mesenchymal Shift of Glioblastoma. *Adv Sci (Weinh).* 2022 Jan;9(2): e2102768. doi: 10.1002/advs.202102768.
556. Yoshida Y, et al. The expression level of sphingosine-1-phosphate receptor type 1 is related to MIB-1 labeling index and predicts survival of glioblastoma patients. *J. Neurooncol.* 2010; 98:41–47. doi: 10.1007/s11060-009-0064-5.
557. Young RM, Jamshidi A, Davis G, Sherman JH. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Transl Med.* 2015 Jun;3(9):121. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10.
558. Yu Y, Wang A, Wang S, Sun Y, Chu L, Zhou L, Yang X, Liu X, Sha C, Sun K, Xu L. Efficacy of Temozolomide-Conjugated Gold Nanoparticle Photothermal Therapy of Drug-Resistant Glioblastoma and Its Mechanism Study. *Mol Pharm.* 2022 Apr 4;19(4):1219-1229. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00083.
559. Zaheer, Y., Vorup-Jensen, T., Webster, T. J., Ahmed, M., et al. Protein based nanomedicine: Promising therapeutic modalities against inflammatory disorders *Nano Select.* 2022, 3, 733. <https://doi.org/10.1002/nano.202100214>
560. Zhang L, Yan J, Liu Y, Zhao Q, Di C, Chao S, Jie L, Liu Y, Zhang H. Contribution of caspase-independent pathway to apoptosis in malignant glioma induced by carbon ion beams. *Oncol Rep.* 2017 May;37(5):2994-3000. doi: 10.3892/or.2017.5529.
561. Zhang L, Zhu K, Zeng H, Zhang J, Pu Y, Wang Z, Zhang T, Wang B. Resveratrol solid lipid nanoparticles to trigger credible inhibition of doxorubicin cardiotoxicity. *Int J Nanomedicine.* 2019 Jul 31; 14:6061-6071. doi: 10.2147/IJN.S211130
562. Zhang W, Duan R, Zhang J, Cheung WKC, Gao X, Zhang R, Zhang Q, Wei M, Wang G, et al. H1/pHGFK1 nanoparticles exert anti-tumoural and radiosensitising effects by inhibition of MET in glioblastoma. *Br J Cancer.* 2018 Feb 20;118(4):522-533. doi: 10.1038/bjc.2017.461
563. Zhang Y, Sun C, Zhang Q, Deng Y, Hu X, Chen P. Intranasal delivery of Paclitaxel encapsulated nanoparticles for brain injury due to Glioblastoma. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2020 Jan-Dec; 18:2280800020977170. doi: 10.1177/2280800020977170.
564. Zheng L, Hu F, Li J, Wang Z, Deng L, Xiao B, Li J, Lei X. WDR1 predicts poor prognosis and promotes cancer progression in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018 Dec 1;11(12):5682-5693
565. Zhu MM, Wang L, Yang D, Li C, et al. Wedelolactone alleviates doxorubicin-induced inflammation and oxidative stress damage of podocytes by IκK/IκB/NF-κB pathway. *Biomed Pharmacother.* 2019 Sep; 117:109088. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109088.
566. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* 2014 Sep 15;74(18):5057-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3723

567. Zhu Y, Wang F, Zhao Y, Zheng X. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia: a literature review of pharmaceutical and clinical aspects. *Eur J Hosp Pharm.* 2020 Jun 26;28(3):124–8. doi: 10.1136/ejhpharm-2020-002311.
568. Zlokovic BV, Hyman S, McComb JG, Lipovac MN, et al. Kinetics of arginine-vasopressin uptake at the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jun 27;1025(2):191-8. doi: 10.1016/0005-2736(90)90097-8.
569. Zloković BV, Lipovac MN, Begley DJ, Davson H, Rakić L. Transport of leucine-enkephalin across the blood-brain barrier in the perfused guinea pig brain. *J Neurochem.* 1987 Jul;49(1):310-5. doi: 10.1111/j.1471-4159.1987.tb03431.x.
570. Zlokovic BV, Mackic JB, Djuricic B, Davson H. Kinetic analysis of leucine-enkephalin cellular uptake at the luminal side of the blood-brain barrier of an in situ perfused guinea-pig brain. *J Neurochem.* 1989 Nov;53(5):1333-40. doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb08522.x
571. Zong H, Parada LF, Baker SJ. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan 29;7(5): a020610. doi: 10.1101/cshperspect.a020610
572. Zong H, Verhaak RG, Canoll P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 May;12(4):383-94. doi: 10.1586/erm.12.30
573. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci.* 2003;6(1):43-50. doi:10.1038/nn980
574. Zucchi R, Danesi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2003 Mar;3(2):151-71. doi: 10.2174/1568011033353434
575. Nikitin MP. Non-complementary strand commutation as a fundamental alternative for information processing by DNA and gene regulation. *Nat Chem.* 2023;15(1):70-82. doi:10.1038/s41557-022-01111-y