

# Комбинация наносомальной формы доксорубина, интерферона альфа и нитроглицерина в терапии крыс Вистар с глиобластомой 101.8

\*В. В. КУДЕЛЬКИНА, А. С. ХАЛАНСКИЙ, А. И. АЛЕКСЕЕВА,  
П. Л. ГОРЕЛИКОВ, А. М. КОСЫРЕВА

ФГБНУ НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына, Москва, Российская Федерация

## Combination of Nanosomal Form of Doxorubicin, Interferon Alpha, and Nitroglycerin in the Treatment of 101.8 Glioblastoma in Wistar Rats

\*VERA V. KUDELKINA, ALEXANDER S. KHALANSKY,  
ANNA I. ALEKSEEVA, PETR L. GORELIKOV, ANNA M. KOSYREVA

A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

### Резюме

Поиск эффективных подходов лечения пациентов с глиобластомой является одной из сложных задач нейронауки, стандартные методы терапии показывают ограниченные результаты. Комбинированная терапия, включающая разные противоопухолевые механизмы, позволяет повысить её эффективность. В нашей работе исследовали сочетание PLGA-наносомальной формы доксорубина (Докс-PLGA), противоопухолевого цитокина — интерферона  $\alpha$  (ИФН $\alpha$ ) и донора оксида азота (NO) нитроглицерина (НГ) как в системе *in vitro* (глиома С6 крысы), так и *in vivo* (глиобластома 101.8, крысы). МТТ-анализ на клеточной культуре С6 показал большую цитотоксичность и антипролиферативный эффект комбинации ИФН $\alpha$  с Докс-PLGA и НГ. Наименьшую выживаемость опухолевых клеток наблюдали при использовании высокой дозы ИФН $\alpha$  (10 нг/мл) в монорежиме. В эксперименте *in vivo* 32 самкам крыс Вистар с глиобластомой 101.8 проводили терапию в следующих режимах: Докс-PLGA+НГ; Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ ; Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ +НГ. Для всех групп с терапией отмечено достоверное увеличение медианной выживаемости и продолжительности жизни (УПЖ) относительно группы без лечения. Наибольшую медианную продолжительность жизни (27 сут), выживаемость до 100 сут (1 животное), УПЖ (131%) наблюдали у животных, получавших комбинацию Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ +НГ, по сравнению с группой без лечения, в которой медианная продолжительность жизни составила 15 сут. Таким образом, терапия экспериментальной глиобластомы как в системе *in vivo*, так и *in vitro* комбинацией Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ +НГ оказывает наиболее выраженный терапевтический и противоопухолевый эффект, что необходимо учитывать при разработке новых более эффективных методов лечения глиобластом человека.

**Ключевые слова:** глиобластома 101.8; глиома С6; оксид азота; доксорубин-PLGA; интерферон альфа, крысы Вистар

**Для цитирования:** Куделькина В. В., Халанский А. С., Алексеева А. И., Гореликов П. Л., Косырева А. М. Комбинация наносомальной формы доксорубина, интерферона альфа и нитроглицерина в терапии крыс Вистар с глиобластомой 101.8. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021; 66: 9–10: 17–23. doi: 10.24411/0235-2990-2021-66-9-10-17-23.

### Abstract

The search for effective approaches to the treatment of patients with glioblastoma is one of the difficult tasks of neuro-oncology; standard methods of therapy show limited results. Combined therapy, which includes different antitumor mechanisms, can increase its effectiveness. The combination of PLGA nanoform of doxorubicin (Dox-PLGA), antitumor cytokine — interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), and nitrogen oxide (NO) donor nitroglycerin (NG) was investigated in this work both *in vitro* (rat C6 glioma) and *in vivo* (rat 101.8 glioblastoma). MTT assay in the C6 cell line showed great cytotoxicity and antiproliferative effect of the combination of IFN- $\alpha$  with Dox-PLGA and NG. The lowest tumour cell survival was observed when using a high dose of IFN- $\alpha$  (10 ng/ml) in mono-mode. In the *in vivo* experiment, 32 female Wistar rats with 101.8 glioblastoma received therapy in the following modes: Dox-PLGA + NG; Dox-PLGA + IFN- $\alpha$ ; Dox-PLGA + IFN- $\alpha$  + NG. There was a significant increase in median survival and life expectancy (ILE) in all groups receiving therapy compared to the group that did not undergo treatment. The longest median lifespan (27 days), survival up to 100 days (1 animal), ILE (131%) were observed in animals that received the combination Dox-PLGA + IFN- $\alpha$  + NG, compared to the group without treatment, in which the median lifespan was 15 days. Thus, the therapy of experimental

glioblastoma both *in vivo* and *in vitro* with the combination of Dox-PLGA + IFN- $\alpha$  + NG has the most pronounced therapeutic and antitumor effect, which must be taken into account when developing new more effective methods of treating human glioblastomas.

**Keywords:** 101.8 glioblastoma; C6 glioma; nitrogen oxide; doxorubicin-PLGA; interferon alpha, Wistar rats

**For citation:** Kudelkina V. V., Khalansky A. S., Alekseeva A. I., Gorelikov P. L., Kosyreva A. M. Combination of nanosomal form of doxorubicin, interferon alpha, and nitroglycerin in the treatment of 101.8 glioblastoma in Wistar rats. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2021; 66: 9–10: 17–23. doi: 10.24411/0235-2990-2021-66-9-10-17-23.

## Введение

Глиобластома (ГБ) — наиболее часто встречаемая опухоль среди первичных злокачественных опухолей головного мозга взрослых с крайне неблагоприятным прогнозом. Существующий стандарт лечения включает хирургическое удаление с последующей радио- и химиотерапией темозоломидом. Несмотря на улучшение краткосрочной выживаемости пациентов с ГБ при стандартной терапии, пятилетняя выживаемость остаётся неудовлетворительной, составляя около 5% [1].

Противоопухолевый антибиотик доксорубин (Докс) широко используется в химиотерапии пациентов с разными солидными новообразованиями [2]. Отмечена его высокая цитотоксичность для клеток глиомы *in vitro*. Однако он не применяется в нейроонкологии, так как считается, что он не проникает через ГЭБ, являясь субстратом для одного из белков множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) — Р-гликопротеина. Для адресной доставки доксорубина к клеткам опухоли используют полимерные наночастицы PLGA, которые избирательно проникают через патологически изменённые сосуды опухоли, накапливаются в ткани ГБ и способствуют снижению МЛУ [3]. Ранее в работах показано повышение противоопухолевой эффективности Докс-PLGA, при этом в комплексе с сурфактантом PS 80 [4] и полоксамером Р 188 [5] эффекты доксорубина усиливались [6]. Полагают, что при системном введении наночастиц PLGA, покрытых полоксамером Р 188, на их поверхности адсорбируются аполипопротеины Е и А, которые взаимодействуют с рецепторами ЛПНП на мембранах эндотелиальных клеток и таким образом опосредуя эндоцитоз наночастиц в эти клетки с последующим их поступлением в ГБ трансцитозом [7].

Несмотря на более выраженный противоопухолевый эффект Докс-PLGA по сравнению с Докс, терапия ГБ остаётся сложной задачей. Необходимы новые терапевтические подходы для улучшения выживаемости больных с ГБ. Молекулярно-генетическая нестабильность и гетерогенность ГБ, иммуносупрессивная среда, выраженный инфильтративный рост и устойчивость к различным апоптотическим стимулам препятствуют успешной терапии [8, 9]. Известно, что в солидных опухолях экстравазация макромолекул

значительно усиливается, что связывают с феноменом повышенной проницаемости и удержания макромолекул (EPR — the enhanced permeability and retention effect). Атипичные кровеносные сосуды опухоли имеют неполноценное строение, которое обуславливает патологию кровообращения: окклюзии, эмболии, тромбозы, кровоизлияния, что препятствует поступлению противоопухолевых веществ в ткани опухоли при их системном введении. Установлено, что эффект EPR [10] опосредуется сосудистыми медиаторами: NO, брадикинином, простагландинами и факторами роста эндотелия сосудов [11, 12]. Для увеличения накопления в опухоли противоопухолевых веществ, в том числе в составе наноносителей, применяют вазодилататоры. Одни из них — нитроглицерин (НГ) и нитросорбид, которые используют в качестве доноров NO [13–15]. Известно, что NO, воздействуя на эндотелий сосудов опухоли, увеличивает его проницаемость, что может повышать противоопухолевый эффект доксорубина при терапии глиобластомы 101.8 у крыс [16, 17]. Иммуносупрессия в опухоли создаётся и поддерживается как самой опухолью [18], так и системной химиотерапией. Следовательно, преодоление иммуносупрессии, усиление проницаемости сосудов ГБ для противоопухолевых веществ, как и ингибирование МЛУ, имеют решающее значение для успешной противоопухолевой терапии [19]. Установлено, что иммуносупрессия, при химиотерапии, может быть скомпенсирована применением цитокина интерферона альфа (ИФН $\alpha$ ). ИФН $\alpha$  — это эндогенный гликопротеин, выделяемый различными иммунными клетками с противовирусной, антимикробной и противоопухолевой активностью, который применяется в терапии в рекомбинантной форме [20]. Известны противоопухолевые свойства ИФН I типа ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ), которые используются при лейкемии, меланоме, карциноме почки, саркоме Капоши, волосатоклеточном лейкозе, филаделфий-отрицательных миело-пролиферативных новообразованиях [20–23]. Имеются свидетельства противоопухолевой активности ИФН в комбинации с химиотерапией при ГБ *in vitro* [24] и *in vivo* [25]. ИФН I типа сенсibiliзируют резистентные клетки глиомы человека к терапии темозоломидом *in vitro* за счёт подавления экспрессии MGMT (ген O(6)-метил-

**Таблица 1. Экспериментальные группы, дозы исследуемых препаратов *in vitro*\***  
**Table 1. Experimental groups, *in vitro* doses of studied drugs\***

Контроль	—
ИФН $\alpha$ 5000	5000 МЕ/мл
ИФН $\alpha$ 500+НГ	ИФН $\alpha$ 500 МЕ/мл и НГ 10 $\mu$ моль/л
Докс-PLGA+НГ	Докс-PLGA 10 мкг/мл (по Докс) и 10 $\mu$ моль/л НГ
ИФН $\alpha$ 500+НГ+Докс-PLGA	ИФН $\alpha$ 500 МЕ/мл, НГ 10 $\mu$ моль/л и Докс-PLGA 10 мкг/мл (по Докс)

**Примечание.** \* — исследуемые препараты растворяли в 0,1% водном растворе поллоксамера Р 188.

**Note.** \* — the studied preparations were dissolved in a 0.1% aqueous solution of poloxamer 188.

**Таблица 2. Режим и дозы введение исследуемых препаратов животным с глиобластомой 101.8**  
**Table 2. The regimen and doses of the studied drugs' administration to animals with 101.8 glioblastoma\***

Без лечения, n=9	—
Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ , n=5	Докс-PLGA в дозе 1,5 мг/кг (по Докс) в/в на 2-е, 5-е и 8-е сутки после имплантации; ИФН $\alpha$ подкожно (холка) в дозе 450 тыс. МЕ/кг ежедневно со 2-го дня после имплантации, 10 дней
Докс-PLGA+НГ, n=10	Докс-PLGA в дозе 1,5 мг/кг (по Докс) в/в на 2-е, 5-е и 8-е сутки после имплантации; НГ в/в в дозе 62 мкг/кг с интервалом введения на 2-е, 5-е и 8-е сутки после имплантации
Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ +НГ, n=7	Докс-PLGA в дозе 1,5 мг/кг (по Докс) в/в на 2-е, 5-е и 8-е сутки после имплантации; ИФН $\alpha$ подкожно в дозе 450 тыс. МЕ/кг ежедневно со 2-го дня после имплантации, 10 дней; НГ в/в в дозе 62 мкг/кг с интервалом введения на 2-е, 5-е и 8-е сутки после имплантации

гуанин-ДНК-метилтрансферазы, кодирует фермент репарации ДНК) и активации сигнального пути p53 (белок супрессор опухоли) [24], в некоторых случаях данная комбинация препаратов, была более эффективна у пациентов с ГБ, чем монорежим темозоломидом [22, 25].

Возможно, что эффективность Докс-PLGA терапии при ГБ можно повысить с помощью комбинации препаратов, усиливающих его действие: донором оксида азота (NO) НГ и провоспалительным цитокином ИФН $\alpha$ . Поэтому, цель нашей работы заключалась в оценке ранее не исследованного сочетанного действия наноформы химиопрепарата (Докс-PLGA) с вазодилататором НГ и с провоспалительным, антипролиферативным цитокином ИФН $\alpha$  на моделях ГБ *in vitro* и *in vivo*.

## Материал и методы

### Исследуемые препараты

1. Интерферон альфа, лиофилизат (ИНФ $\alpha$ , НПО Микросин, Россия) для *in vitro*.
2. Интерферон альфа, лиофилизат (ИНФ $\alpha$ , ООО Агровет, Россия) для *in vivo*.
3. Нитроглицерин, лиофилизат (НГ, ООО ОЗОН, Россия).
4. Доксорубин-PLGA (Докс-PLGA, 50:50, партия 1941), лиофилизат. 79% Докс связано с полимером (ООО Технология лекарств, Россия).

### Исследование *in vitro*

**Объект исследования** — культура перевиваемой линии клеток глиомы С6 крысы, которая применяется в качестве биологической модели в системе доклинического скрининга противоопухолевых веществ [26].

**Культирование глиомы С6.** Для получения клеточной модели перевиваемую глиому С6, хранящуюся в атмосфере жидкого азота, размораживали и выращивали сначала в пластиковых флаконах, а затем на 96-луночных планшетах в количестве  $10^4$  клеток на лунку, инкубировали 24 ч до получения монослоя. Клетки культивировали в среде IMDM GLUTA MAX (GIBCO, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone,

США) или без неё (бессывороточная культуральная среда), 0,1 мг/мл антибиотика пенициллина+стрептомицина (GIBCO, США) при  $t=37,0^\circ\text{C}$ , в атмосфере 5% углекислого газа.

**Оценка метаболической активности клеток С6, МТТ-тест.** Исследование метаболической активности клеток оценивали по восстановлению солей тетразолия МТТ (Sigma, США). Через 24 ч после субкультивирования на 96-луночных планшетах и образования монослоя к клеткам опытной группы добавляли исследуемые препараты или их комбинации (по 6 повторов на каждый препарат или комбинацию). Препараты растворяли в 1% растворе Р 188 или на бессывороточной среде (табл. 1). Через 24 ч после инкубации с исследуемыми препаратами был проведен цитотоксический тест: в лунки было добавлено 0,02 мл 5% раствора МТТ-реагента, после 2 ч инкубации среда была удалена из лунок и был добавлен растворитель ДМСО. Проводили спектрофотометрию на микропланшетном ридере (Anthos 2010, Австрия) при длине волны 495 нм. Жизнеспособность рассчитывали по формуле: % жизнеспособных клеток =  $\text{Do/Dk} \times 100\%$ ; где: Do — оптическая плотность раствора в опытной группе и Dk — оптическая плотность раствора в контроле [27].

### Исследование *in vivo*

**Объект исследования** — глиобластома 101.8 крыс, соответствующая требованиям ВОЗ для перевиваемой глиобластомы и имеющая высокую воспроизводимость при интракраниальной пересадке животным [28].

Эксперимент выполнен на 32 самках крыс Вистар массой тела 200–300 г. (филиал «Столбовая» НЦБТ ФМБА России). Животных содержали в условиях вивария при температуре  $23\pm 3^\circ\text{C}$  и относительной влажности 35–65%. Доступ к воде и корму был свободным. При работе с животными руководствовались Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказ Ростехрегулирования № 544-ст от 02.12.2009, ГОСТ Р 53434-2009), ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с грызунами и кроликами», соблюдали принципы гуманного обращения в соответствии с директивой Европейского парламента и совета ЕС2010/63/EU статья 6 по охране животных, используемых в научных целях. На проведение работы было получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека». В работе использовали штамм глиобластомы 101.8 крыс Вистар из коллекции клеточных линий и штаммов опухолей нервной системы ФГБНУ «НИИ морфологии человека».

**Таблица 3. Жизнеспособность клеточной линии глиомы С6 при воздействии исследуемых препаратов и их сочетаний, Me (Q1; Q3)**

**Table 3. Viability of C6 glioma cell lines under the influence of the studied drugs and their combinations, Me (Q1; Q3)**

Контроль	100 (98; 101)
ИФН $\alpha$ 5000	14 (11; 16)*; $p < 0,001^{\#}$
Докс-PLGA+ИГ	47 (44; 49)
ИФН $\alpha$ 500+ИГ	54 (53; 60)*
ИФН $\alpha$ 500+ИГ+Докс-PLGA	30 (27; 34)*; $p < 0,001^{\#}$

**Примечание.**  $\#$  — препараты растворяли в 0,1% водном растворе полоксамера Р 188; \* — относительно контрольной группы;  $\#$  — бессывороточная культуральная среда.

**Note.**  $\#$  — preparations were dissolved in 0.1% aqueous solution of poloxamer 188; \* — relative to the control group;  $\#$  — serum-free culture medium.

**Таблица 4. Продолжительность жизни и выживаемость животных с глиобластомой 101.8**

**Table 4. Life expectancy and survival rate of animals with 101.8 glioblastoma**

Экспериментальные группы	N	N/ G+	N/ G–	СПЖ, сут.	Me (Q1; Q2), сут.	УПЖ (%)
ГБ без лечения	9	9	0	16	15 (14; 17)	
Докс-PLGA+ИФН $\alpha$	5	5	0	28	27 (23; 28); $p < 0,05^*$	75
Докс-PLGA+ИГ	10	10	0	29	27 (25; 35); $p < 0,001^*$	81
Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ +ИГ	8	7	1	37	27 (26; 37); $p < 0,001^*$	131

**Примечание.** N/G — количество животных без (–) с (+) глиомой; СПЖ — средняя продолжительность жизни; Me — медианная продолжительность жизни;  $\#$  — препараты растворяли в 1% водном растворе полоксамера Р 188; УПЖ — увеличение продолжительности жизни относительно группы без лечения; \* — статистические различия с группой без лечения.

**Note.** N/G — number of animals without (–) and with (+) glioma; ALE — the average life expectancy; Me — the median life expectancy;  $\#$  — preparations were dissolved in 1% aqueous solution of poloxamer 188; ILE — increase in life expectancy relative to the group without treatment; \* — statistical differences compared to the group without treatment.

Моделирование глиобластомы 101.8 детально описано в статье ранее [29]. Ткань опухоли трансплантировали под наркозом (Золетил) в область полосатого тела головного мозга крыс.

Животные с имплантированной опухолью были разделены на группы (табл. 2).

Исследование противоопухолевого действия препаратов проводили в соответствии с руководством по доклиническому исследованию лекарственных средств [30]. Противоопухолевую активность тестируемых форм оценивали по средней продолжительности жизни (СПЖ, сут), выживаемости и показателям увеличения продолжительности жизни (УПЖ %).

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

Для графического изображения специфической активности препаратов также строили кривые Каплана–Майера. Для этого на оси абсцисс отмечали дни наблюдения, а на оси ординат — процент выживших на данный момент животных. Наблюдение проводили в течение 100 сут жизни животных с последующим морфологическим исследованием головного мозга.

#### Статистическая обработка результатов

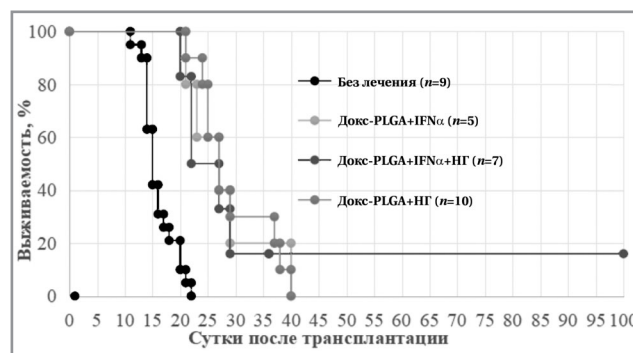
Данные анализировали в программе STATISTICA 8.1. Количественные данные между группами сравнивали с помощью непараметрического *H*-критерия Краскела–Уоллиса. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В системе *in vivo* мы оценивали цитотоксичность комбинации противоопухолевых веществ на клеточной линии глиомы С6. По результатам МТТ-теста выживаемость интактного контроля составила 100%. Все исследуемые препараты и их комбинации в указанных дозах статистически значимо снижали выживаемость клеток глиомы С6 (табл. 3). Выживаемость клеток при сочетании

Докс-PLGA+ИГ+ИФН $\alpha$  по сравнению с контрольной группой составила 30% ( $p < 0,001$ ) и была ниже, чем в группах Докс-PLGA+ИГ и Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ . Анализ множественных сравнений выживаемости клеток глиомы С6 в исследованных группах показал наибольшее ( $p < 0,001$ ; 14% выживаемость) ингибирующее воздействие на клетки опухоли высокой дозы ИФН $\alpha$  (5000 МЕ/мл).

В эксперименте *in vivo* средняя продолжительность жизни крыс с глиобластомой 101.8 составила 16 сут, медианная продолжительность жизни — 15 сут (табл. 4, рисунок). Во всех группах животных с терапией статистически значимо уве-



**Кривые выживаемости Каплана–Майера животных с глиобластомой 101.8 и при комбинированной терапии Докс-PLGA+ИФН $\alpha$ +ИГ, Докс-PLGA+ИГ, Докс-PLGA+ИФН $\alpha$**

**Kaplan–Meier survival curves in animals with 101.8 glioblastoma undergoing combined therapy with Dox-PLGA + IFN- $\alpha$  + NG, Dox-PLGA + NG, Dox-PLGA + IFN- $\alpha$**



личивался показатель УПЖ относительно группы без лечения. УПЖ для групп животных, получавших Докс-PLGA+ ИФН $\alpha$  + НГ, составило 131% (СПЖ 37 сут.; Ме 27;  $p<0,001$ ) относительно не получавших лечение животных. Комбинация Докс-PLGA и ИФН $\alpha$  увеличивало медиану продолжительности жизни животных до 27 сут (СПЖ 28 сут.;  $p<0,05$ ; УПЖ 75%) относительно животных без терапии. Комбинация Докс-PLGA+НГ увеличивала СПЖ до 29 сут (Ме 27сут.;  $p<0,05$ ), УПЖ составило 81% относительно группы животных без лечения.

Таким образом, показано значительное повышение цитотоксичности для клеток глиомы C6 *in vitro* при применении ИФН $\alpha$  +Докс-PLGA+НГ, особенно при высокодозном монорежиме ИФН $\alpha$  (5000 МЕ/мл). На интракраниальной глиобластоме 101.8 крыс выявлено статистически значимое УПЖ в группе животных, получавших Докс-PLGA в комбинации с ИФН $\alpha$  и НГ.

Модели глиальных опухолей головного мозга глиомы C6 и глиобластомы 101.8 используют в экспериментальной нейроонкологии *in vitro* и *in vivo* для оценки противоопухолевой активности разных веществ. Ранее нами было установлено, что Докс-PLGA оказывает более выраженное терапевтическое действие на глиобластому 101.8, чем Докс [5], однако проблема низкой продолжительности жизни и выживаемости не решена. Поэтому мы пробовали усилить терапевтический эффект Докс-PLGA сочетанием с донорами NO и ИФН $\alpha$ .

Известно, что эффекты доноров NO разнообразны: ингибирование Р-гликопротеина путём изменения его конформации [31], повышение проницаемости эндотелия сосудов [32], что способствует накоплению цитостатиков в опухоли [33] и увеличивает их терапевтическое действие при ГБ 101.8 у крыс [16]. Показано увеличение продолжительности жизни (на 75–125%) и уменьшение объёма ГБ 101.8 у крыс Вистар при комбинации Докс с NO [16]. NO в зависимости от дозы может оказывать двойное действие (про- и противоопухолевое) на опухоль, так эндогенные NO могут способствовать развитию новообразования, тогда как экзогенные NO могут наоборот быть цитотоксичны [34].

Поскольку одним из проявлений ГБ и побочным действием химиотерапии является выраженная иммуносупрессия [18], целесообразно применение ИФН $\alpha$ , который обладает как прямым антипролиферативным действием на опухолевые клетки [35], так и опосредованным — че-

рез активацию иммунной системы [36]. ИФН $\alpha$  в сочетании с цис-ретиноевой кислотой повышает чувствительность рецидивирующей ГБ к радиотерапии [37]. Большой терапевтический эффект ИФН $\alpha$  наблюдали при его сочетании с химиотерапией или таргетными препаратами [36, 38]. В эксперименте показано, что ИФН I типа подавляют продукцию факторов роста, замедляя рост опухоли, и препятствуют выработке факторов роста сосудов, блокируя ангиогенез опухоли [39]. ИФН $\alpha$  модулирует представление МНС класса I цитотоксическим Т-клеткам, тем самым выявляя опухолевую мишень [40]. Более высокая экспрессия МНС класса I повышает представление опухолевых пептидов цитотоксическим Т-клеткам, в то время как иммунопротеосома подготавливает опухолевые пептиды для загрузки в молекулу МНС класса I, увеличивая распознавание и уничтожение опухолевых клеток цитотоксическими Т-клетками. Известно, что ИФН $\alpha$  активирует НК-клетки и макрофаги, которые продуцируют ИФН $\gamma$ , регулирующий экспрессию МНС класса II для Т-хелперов и других CD 4+ клеток [41]. Нарушение передачи сигналов ИФН I типа коррелирует с худшим прогнозом и более низкой терапевтической реакцией опухоли [42, 43]. Есть предположение, что ИФН- $\alpha$  может сдерживать пролиферацию стволовых клеток опухоли [44–46]. Поскольку ИФН могут продуцироваться как опухолевыми клетками, так и иммунными клетками, понимание их взаимодействия позволит разработать лучшие методы лечения, которые используют сигнальные пути ИФН.

Необходимы дальнейшие исследования по изучению механизмов синергического действия терапевтических методов и комплексов препаратов, выявление молекулярных маркеров опухоли, от которых зависит чувствительность к данной терапии. Подбор носителей для эффективной таргетной доставки, режимов и доз препаратов также важны.

## Заключение

Таким образом, показано повышение эффективности терапии крыс с глиобластомой 101.8 цитостатиком доксорубицином в составе PLGA наночастиц в комбинации с вазодилататором NO нитроглицерином и провоспалительным цитокином ИФН $\alpha$ , что необходимо учитывать при разработке новых более эффективных методов лечения глиобластом человека.

## Литература/References

1. Ostrom Q.T., Gittleman H., Farah P. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol.* 2013; 15 (Suppl 2): 1–56. doi: 10.1093/neuonc/not151.

2. Thorn C.F. Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011; 21 (7): 440–446.
3. Балабаньян В.Ю. Гельперина С.Э. Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2012; 2: 3–9. [Balaba-

- n'yan V.Jyu. Gel'perina S.E. Osnovnye mekhanizmy dostavki lekarstvennykh veshchestv v mozg s pomoshch'yu polimernykh nanochastits. Farmakokinetika i Farmakodinamika. 2012; 2: 3–9. (in Russian)]*
4. Petri B., Bootz A., Khalansky A., Hekmatara T., Müller R., Uhl R. 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 Jan 22; 117 (1): 51–58. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.10.015.
  5. Федосеева В.В., Постовалова Е.А., А.С. Халанский, В.А. Разживина, С.Э. Гельперина, О.В. Макарова. Лекарственный патоморфоз глиобластомы 101.8 у крыс вистар при лечении наноразмерной формой доксорубина на основе полилактидных наночастиц. Современные технологии в медицине. 2018; 10: 4: 105–112. [Fedoseeva V. V., Postovalova E. A., A. S. Khalanskij, V. A. Razzhivina, S. E. Gel'perina, O. V. Makarova. Lekarstvennyj patomorfoz glioblastomy 101.8 u krysv vistar pri lechenii nanorazmernoj formoj doksorubitsina na osnove polilaktidnykh nanochastits. Sovremennye tekhnologii v meditsine. 2018; 10: 4: 105–112. (in Russian)]
  6. Sanchez De Juan B., Von Briesen H., Gelperina S. E., Kreuter J. Cytotoxicity of doxorubicin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in rat glioma cell lines using different assays J Drug Target. 2006 Nov; 14 (9): 614–622. doi: 10.1080/10611860600866872.
  7. Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? Adv Drug Deliv Rev. 2014; 71: 2–14. doi: 10.1016/j.addr.2013.08.008. Epub 2013 Aug 24.
  8. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144 (5): 646–674.
  9. Weller M., Wick W., Aldape K. et al. Glioma. Nat Rev Dis Primers. 2015; 1: 15017.
  10. Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 1986; 46: 6387–6392.
  11. Maeda H., Noguchi Y., Sato K., Akaike T. Enhanced vascular permeability in solid tumor is mediated by nitric oxide and inhibited by both new nitric oxide scavenger and nitric oxide synthase inhibitor. Jpn J Cancer Res. 1994; 85: 331–334.
  12. Wu J., Akaike T., Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and nitric oxide scavenger. Cancer Res. 1998; 58: 159–165.
  13. Fukuto J.M., Cho J.Y., Switzer C.H. The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. In: L.J. Ignarro (ed.). Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. San Diego, CA: Academic Press, 2000; 23–39.
  14. Feelisch M., Noack E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. Eur J Pharmacol. 1987; 139: 19–30.
  15. Chen Z., Stamler J.S. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Trends Cardiovasc Med. 2006; 16: 259–265.
  16. Алексеева А.И., Халанский А.С., Федосеева В.В., Гореликов П.Л., Гельперина С.Э. Влияние донора оксида азота на противоопухолевую активность доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы крыс. Антибиотики и химиотер. 2018; 63 (7–8): 17–21. doi: 10.24411/0235-2990-2018-00029. [Aleksееva A.I., Khalanskij A.S., Fedoseeva V.V., Gorelikov P.L., Gel'perina S.E. Vliyanie donora oksida azota na protivopukhlevuju aktivnost' doksorubitsina v otnoshenii eksperimental'noj glioblastomy krysv. Antibiotiki i khimioter. 2018; 63 (7–8): 17–21. doi: 10.24411/0235-2990-2018-00029. (in Russian)]
  17. Seki T., Fang J., Maeda H. Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application. Cancer Sci. 2009; 100: 2426–2430. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01323
  18. Dix A.R., Brooks W.H., Roszman T.L., Morford L.A. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. J neuroimmunol. 1999 Dec; 100 (1–2): 216–232. doi: 10.1016/S0165-5728(99)00203-9
  19. Fang J., Islam R., Islam W., Yin H., Subr V., Etrych T. et al. Augmentation of EPR effect and efficacy of anticancer nanomedicine by carbon monoxide generating agents. Pharmaceutics. 2019 Jul; 11 (7): 43. doi: 10.3390/pharmaceutics11070343.
  20. Baron S., Tying S.K., Fleischmann W.R. et al. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. JAMA. 1991; 266 (10): 1375–1383.
  21. Gogas H., Abali H., Ascierto P.A., Demidov L., Pehamberger H., Robert C. et al. Who benefits most from adjuvant interferon treatment for melanoma? Am J Ther. 2015 Jan–Feb; 22 (1): 54–60. doi: 10.1097/MJT.0b013e31829e883d.
  22. Kirkwood J. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. Semin Oncol. 2002 Jun; 29 (Suppl 7): 18–26. doi: 10.1053/sonc.2002.33078.
  23. Mondello P., Di Mirto C., Cuzzocrea S., Arrigo C., Mian M., Pitini V. Interferon alpha has a strong anti-tumor effect in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2019 Aug; 19 (8): e489–e495. doi: 10.1016/j.clml.2019.03.027.
  24. Natsume A., Ishii D., Wakabayashi T. IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. Cancer Res. 2005; 65: 7573–7579.
  25. Groves M.D., Puduvalli V.K., Gilbert M.R. et al. Two phase II trials of temozolomide with interferon-alpha2b (pegylated and non-pegylated) in patients with recurrent glioblastoma multiforme. Br J Cancer. 2009; 101 (4): 615–620. doi: 10.1038/sj.bjc.6605189.
  26. Bouf-Muraille G., Rigaux G., Callewaert M., Zambran N., Van Glick L., Roullin V. et al. Evaluation of mTHPC-loaded PLGA nanoparticles for in vitro photodynamic therapy on C6 glioma cell line. Photodiagnosis Photodynamic Ther. 2019; 25 448–455. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.026. Epub 2019 Jan 29.
  27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assay. J Immunol Meth. 1983; 65: 55–63.
  28. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. Биологическая характеристика. Клиническая и экспериментальная морфология. 2013; 4: 63–69. [Khalanskij A.S., Kondakova L.I. Perevivaemij shtamm gliomy krysy 101.8. Biologicheskaya kharakteristika. Klinicheskaya i Eksperimental'naya Morfologiya. 2013; 4: 63–69. (in Russian)]
  29. Куделькина В.В., Халанский А.С., Макарова О.В., Хомякова Т.И., Цветков И.С., Косырева А.М. с соавт. Сравнительная морфологическая и биохимическая характеристика токсического действия доксорубина и PLGA-доксорубина при лечении экспериментальной глиобластомы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021; 1 (10). [Kudel'kina V.V., Khalanskij A.S., Makarova O.V., Khomyakova T.I., Tsvetkov I.S., Kosyreva A.M. s soavt. Sravnitel'naya morfologicheskaya i biokhimicheskaya kharakteristika toksicheskogo dejstviya doksorubitsina i PLGA-doksorubitsina pri lechenii eksperimental'noj glioblastomy. Klinicheskaya i Eksperimental'naya Morfologiya. 2021; 1 (10). (in Russian)]
  30. Трещалина Е., Жукова О., Герасимова Г. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012; 640–654. [Treshchalina E., Zhukova O., Gerasimova G. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniju protivopukhlevoj aktivnosti lekarstvennykh sredstv. In: Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Ed. A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012; 640–654. (in Russian)]
  31. Riganti C., Miraglia E., Viariso D., Costamagna C., Pescarmona G., Ghigo D., Bosia A. Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux. Cancer Res. 2005 Jan 15; 65 (2): 516–525.
  32. Thiel V.E., Audus K.L. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. Antioxid Redox Signal. 2001 Apr; 3 (2): 273–278. doi: 10.1089/152308601300185223.
  33. Коновалова Н.П., Волкова Л.М., Якущенко О.И. и др. Влияние донора оксида азота на терапевтическую активность цитостатиков и синтез ДНК. Российский биотерапевтический журнал. 2003; 2 (2): 52–55. [Konovalova N.P., Volkova L.M., Yakushchenko O.I. i dr. Vliyanie donora oksida azota na terapevticheskuyu aktivnost' tsitostatikov i sintez DNK. Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2003; 2 (2): 52–55. (in Russian)]
  34. Vannini E., Kashfi K., Nath N. The dual role of iNOS in cancer. Redox Biol. 2015 Dec; 6: 334–343. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.009.
  35. Parker B., Rautela J., Hertzog P. Antitumor actions of interferons: implications for cancer therapy Nat Rev Cancer. 2016; 16 (3): 131–144. doi: 10.1038/nrc.2016.14.
  36. Fritz J., Karakhanova S., Brecht R., Nachtigall I., Werner B., Bazhin A. In vitro immunomodulatory properties of gemcitabine alone and in combination with interferon-alpha. Immunology Letters. 2015; 168: 111–119.
  37. Dillman R.O., Shea W.M., Tai D.E., Mahdavi K., Barth N.M., Kharkar B.R. et al. Interferon-alpha2a and 13-cis-retinoic acid with radiation treatment for high-grade glioma. Neuro Oncol. 2001 Jan; 3 (1): 35–41. doi: 10.1093/neuonc/3.1.35.
  38. Fragale A., Romagnoli G., Licursi V., Buoncervello M., Del Vecchio G., Giuliani C. et al. Antitumor effects of epirubicin/IFN-α combination driven by modulated gene signatures in both colorectal cancer and dendritic cells. Cancer Immunol Res. 2017; 5: 604–616. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0080.
  39. Jablonska J., Leschner S., Westphal K., Lienenklaus S., Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. J Clin Invest. 2010; 120 (4): 1151–1164. doi: 10.1172/JCI37223.
  40. Ferrantini M., Capone I., Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. Biochimie. 2007 Jun–Jul; 89 (6–7): 884–893. doi: 10.1016/j.biochi.2007.04.006.
  41. Litak J., Mazurek M., Grochowski C., Kamieniak P., Roliński J. PD-L1/PD-1 axis in glioblastoma multiforme. Int J Mol Sci. 2019 Nov; 20 (21): 5347. doi: 10.3390/ijms20215347.
  42. Katlinsky K.V., Gui J., Katlinskaya Y.V., Ortiz A., Chakraborty R., Bhattacharya S. et al. Inactivation of interferon receptor promotes the establishment of immune privileged tumor microenvironment. Cancer Cell. 2017; 31: 194–207. doi: 10.1016/j.ccell.2017.01.004.
  43. Katlinskaya Y.V., Katlinsky K.V., Yu Q., Ortiz A., Daniel P., Brice A. et al. Suppression of type I interferon signaling overcomes oncogene-induced senescence and mediates melanoma development and progression. Cell Rep. 2016; 15: 171–180. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.006.

44. Yokota A., Hirai H., Sato R., Adachi H., Sato F., Hayashi Y. *et al.* C/EBP $\beta$  is a critical mediator of IFN- $\alpha$ -induced exhaustion of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood Adv.* 2019; 3: 476–488. doi: 10.1182/bloodadvances.2018020503.
45. Celià-Terrassa T., Liu D.D., Choudhury A., Hang X., Wei Y., Zamalloa J. *et al.* Normal and cancerous mammary stem cells evade interferon-induced constraint through the miR-199a–LCOR axis. *Nat Cell Biol.* 2017; 19: 711–723. doi: 10.1038/ncb3533.
46. Buoncervello M., Romagnoli G., Buccarelli M., Fragale A., Toschi E., Parlato S. *et al.* IFN- $\alpha$  potentiates the direct and immune-mediated antitumor effects of epigenetic drugs on both metastatic and stem cells of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016; 7: 26361–26373. doi: 10.18632/oncotarget.8379.

## Информация об авторах

*Куделькина Вера Владимировна* — научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека имени им. академика А. П. Авцына, Москва, Российская Федерация

*Халанский Александр Сергеевич* — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына, Москва, Российская Федерация

*Алексеева Анна Игоревна* — младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына, Москва, Российская Федерация

*Гореликов Петр Леонидович* — д. б. н., старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына, Москва, Российская Федерация

*Косырева Анна Михайловна* — д. б. н., заведующая лабораторией нейроморфологии НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына, Москва, Российская Федерация

## About the authors

*Vera V. Kudelkina* — Researcher, A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

*Alexander S. Khalansky* — Ph. D. in biology, A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

*Anna I. Alekseeva* — Junior Researcher, A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

*Petr L. Gorelikov* — D. Sc. in biology, A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

*Anna M. Kosyreva* — D. Sc. in biology, A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation