

ISSN 1726-9784 (Print)  
ISSN 1726-9792 (Online)



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossijskij bioterapevticeskij zurnal

Российский Биотерапевтический Журнал  
2025 • том 24 • № 2



**Russian Journal  
of Biotherapy**

**2**

TOM/VOL. 24  
**2025**

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal

теоретический и научно-практический рецензируемый журнал

**Основная задача издания** – публикация информации о современных достижениях в области изучения патогенеза, диагностики и терапии иммуноопосредованных и онкологических заболеваний, результатов научных исследований, национальных и международных доклинических и клинических исследований.

**Цели журнала** – информирование читателя о результатах изучения новых биомаркеров онкологических и иммуноопосредованных заболеваний, использования биомаркеров в диагностике и терапии злокачественных новообразований и патологий иммунной системы, исследований в области лекарственной и клеточной терапии, а также по вопросам технологии создания лекарств, биомедицинских клеточных продуктов и биоматериалов, проведения доклинических и клинических исследований новых препаратов и методов лечения; обобщение научных и практических достижений в области диагностики и терапии иммунологических и онкологических заболеваний.

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

2 <sup>ТОМ 24</sup>  
'25

**Учредитель:**

ФГБУ «НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России

**Адрес учредителя и редакции:**  
115478, Москва, Каширское  
шоссе, 24, стр. 2.

Тел.: +7 (499) 324-10-65  
Факс: +7 (499) 324-22-74

E-mail: bioterapy\_rbj@mail.ru  
rbjournal@ronc.ru

**Адрес издательства:**

115478, Москва, Каширское  
шоссе, 24, стр. 15, НИИ  
канцерогенеза, 3-й этаж.  
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: abv@abvpress.ru

[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

Редактор Ю.Н. Бирюкова  
Корректор Р.В. Журавлева

Дизайн: Е.В. Степанова  
Верстка: О.В. Гончарук

*Журнал зарегистрирован  
в Федеральной службе по надзору  
в сфере связи, информационных  
технологий и массовых  
коммуникаций. Регистрационный  
номер: № 77-11695 от 21.01.2002,  
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013.*

При полной или частичной  
перепечатке материалов  
ссылка на журнал «Российский  
биотерапевтический журнал»  
обязательна.

ISSN 1726-9784 (Print)  
ISSN 1726-9792 (Online)

Российский биотерапевтический журнал.  
2025. Том 24. № 2. 1–88.

© Оформление, верстка.

ООО «ИД «АБВ-пресс», 2025

Подписной индекс в каталоге агентства  
«Роспечать» — 81679.

Отпечатано в типографии «Лайдер принт».  
105082, Москва, Переведеновский пер., 13, стр. 16.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.

<http://bioterapevt.elpub.ru>

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Киселевский Михаил Валентинович**, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

## ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

**Караулов Александр Викторович**, академик РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

**Шпрах Зоя Сергеевна**, д.фарм.н., заведующая лабораторией химико-фармацевтического анализа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

## ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

**Соколова Зинаида Александровна**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Балдуева Ирина Александровна**, д.м.н., доцент, заведующая научным отделом онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

**Бунятян Наталья Дмитриевна**, д.фарм.н., профессор, главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

**Евсегнеева Ирина Валентиновна**, д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

**Краснов Виктор Павлович**, член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (Екатеринбург, Россия)

**Курбатова Екатерина Алексеевна**, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

**Меерович Игорь Геннадьевич**, к.б.н., научный сотрудник департамента фармации Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Каламазу, США)

**Мисюрин Андрей Витальевич**, д.б.н., генеральный директор ООО «Генотехнология» (Москва, Россия)

**Набиев Игорь Руфаилович**, д.х.н., профессор, профессор лаборатории по исследованиям в области нанонаук Реймского университета (Реймс, Франция), ведущий ученый лаборатории нанобиоинженерии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Москва, Россия)

**Новиков Виктор Владимирович**, д.б.н., профессор, профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Нижегородский Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (Нижний Новгород, Россия)

**Оборотова Наталья Александровна**, д.фарм.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Панкратов Андрей Александрович**, к.б.н., руководитель отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научного исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

**Петров Александр Юрьевич**, д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации и химии Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия)

**Рапопорт Наталья Яковлевна**, д.х.н., профессор, почетный профессор департамента биомедицинской инженерии Университета Юты (Солт-Лейк-Сити, США)

**Соколова Татьяна Михайловна**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

**Степанова Евгения Владиславовна**, д.м.н., советник вице-президента РАН (Москва, Россия)

**Титов Константин Сергеевич**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник ГБУЗ «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики им. академика В.П. Харченко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», президент АНО «Национальный альянс специалистов по опухолям наружных локализаций» (Москва, Россия)

**Уласов Илья Валентинович**, д.б.н., ведущий научный сотрудник, лидер группы экспериментальной биотерапии и диагностики Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

**Эстрин Юрий Захарович**, д.ест.н., почетный доктор РАН, действительный член Австралийской академии наук, иностранный член РАН, профессор департамента материаловедения и инжиниринга Университета им. Монаша (Клэйтон, Австралия)

#### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Барышникова Мария Анатольевна**, к.фарм.н., заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Бочарова Ольга Алексеевна**, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунофармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Демидов Лев Вадимович**, д.м.н., профессор, заведующий хирургическим отделением № 10 биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Иванов Павел Константинович**, д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Кадагидзе Заира Григорьевна**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Косоруков Вячеслав Станиславович**, к.б.н., директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Кубасова Ирина Юрьевна**, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Шубина Ирина Жановна**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). Journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

# Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

**The main objective** of Russian Journal of Biotherapy is a publication of current achievements in the study of pathogenesis, diagnostics, and therapy of immune-mediated and oncological diseases, results of the research studies, and results of national and international pre-clinical and clinical studies.

**The publication aim** is to present the results of the studies of new biomarkers of oncological and immune diseases, the use of biomarkers in diagnostics and therapy of tumors and disorders of the immune system, studies in the field of drug and cell therapy, studies of drug development technologies, biomedical cell products and biomaterials, pre-clinical and clinical studies of new medicines and methods of treatment. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of immunological and oncological diseases therapy.

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

2<sup>VOL. 24</sup>  
'25

**Founder:**

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation

**Founder and editorial office:**

Bld. 2, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel.: +7 (499) 324-10-65  
Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: [biotherapy\\_rbj@mail.ru](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[rbjournal@ronc.ru](mailto:rbjournal@ronc.ru)

**Publishing office:**

Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, Bld. 15, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: [abv@abvpress.ru](mailto:abv@abvpress.ru)

[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

Editor **Yu.N. Biriukova**  
Proofreader **R.V. Zhuravleva**  
Designer **E.V. Stepanova**  
Maker-up **O.V. Goncharuk**

*The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media*  
Registration number: ПИ № 77-11695 dated 21.01.2002;  
ПИ № ФС 77-53039 dated 04.03.2013

**If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossijskij bioterapevticeskij zurnal".**

ISSN 1726-9784 (Print)  
ISSN 1726-9792 (Online)

Rossijskij bioterapevticeskij zurnal. 2025. Volume 24. No 2. 1–88.

© Design, layout PH "ABV-Press", 2025

Rospechat' catalogue index: 81679.  
Printed at the Leader Print Ltd  
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane, Moscow 105082.

1,000 copies. Free distribution

<http://bioterapevt.elpub.ru>

## EDITOR-IN-CHIEF

**Kiselevskiy, Mikhail V.**, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

## DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

**Karaulov, Alexander V.**, Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

**Shprakh, Zoya S.**, PhD, DSc, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Professor of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

## EXECUTIVE EDITOR

**Sokolova, Zinaida A.**, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

## EDITORIAL BOARD

**Baldueva, Irina A.**, PhD, DSc, Associate Professor, Head of Research Department of Oncoimmunology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

**Bunyatyan, Natalia D.**, PhD, DSc, Professor, Major Researcher of Center of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of Russia, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

**Evsegneeva, Irina V.**, MD, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

**Krasnov, Viktor P.**, PhD, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Major Researcher, Head of Laboratory of Asymmetrical Synthesis, I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (Ekaterinburg, Russia)

**Kurbatova, Ekaterina A.**, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Therapeutic Vaccines, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

**Meerovich, Igor G.**, PhD, Scientist II of Pharma Department, Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Kalamazoo, USA)

**Misyurin, Andrey V.**, PhD, DSc, General Director of LLC "Gene Technology" (Moscow, Russia)

**Nabiev, Igor R.**, PhD, DSc, Professor, Professor of Laboratory of Studies in the Field of Nanoscience, University of Reims (Reims, France), Leading Scientist of Laboratory Nanobioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute) (Moscow, Russia)

**Novikov, Viktor V.**, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Molecular Biology and Immunology of the Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky Nizhegorodsky State University, Head of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhniy Novgorod, Russia)

**Oborotova, Natalia A.**, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Laboratory of Development of Drug Forms, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Pankratov, Andrey A.**, PhD, Chief of Department of Modifiers and Protectors of Anti-tumor Therapy, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Petrov, Alexander Yu.**, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Pharmacy, Ural's State Medical University (Ekaterinburg, Russia)

**Rapoport, Natalya Ya.**, PhD, DSc., Research Professor Emerita, Department of Biomedical Engineering, University of Utah (Salt Lake City, USA)

**Sokolova, Tatiana M.**, PhD, DSc, Leading Researcher of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Stepanova, Eugenia V.**, PhD, DSc, Advisor to the Vice-President of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

**Titov, Konstantin S.**, MD, PhD, DSc, Professor, Leading researcher at the Moscow Multidisciplinary Scientific and Clinical Center named after S.P. Botkin of the Moscow Department of Health, Professor of the Department of Oncology and Radiology named after Academician V.P. Kharchenko of the Medical Institute of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, President of the National Alliance of Specialists in Tumors of External Localization (Moscow, Russia)

**Ulasov, Ilya V.**, PhD, DSc, Leading Researcher, Leader of the Experimental Biotherapy and Diagnostics Group of the Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

**Estrin, Yuri Z.**, PhD, DSc, Honorary Doctor of the Russian Academy of Sciences, Fellow of the Australian Academy of Science, Foreign member of the Russian Academy of Sciences, Professor of Department of Materials Science and Engineering, Monash University (Clayton, Australia)

#### EDITORIAL COUNCIL

**Baryshnikova, Maria A.**, PhD, Head of Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Bocharova, Olga A.**, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Immunopharmacology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Demidov, Lev V.**, MD, PhD, DSc, Professor, Head of Surgical Department No 10 of Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Ivanov, Pavel K.**, PhD, DSc, Head of Laboratory of Medical Biotechnology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Kadagidze, Zaira G.**, MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Centralized Clinical-Laboratory Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Kosorukov, Vyacheslav S.**, PhD, Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Kubasova, Irina Yu.**, PhD, Scientific Registrar, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Shubina, Irina Zh.**, PhD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*Р.Н. Мустафин***Молекулярно-генетические особенности иммунных механизмов остеоартроза . . . . . 10**

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*П.О. Фёдорова, И.О. Чикилева***Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток — натуральных киллеров . . . . . 22***О.А. Бочарова, А.А. Аксенов, Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, Н.Н. Касаткина, И.В. Казеев, М.В. Уткина, В.Г. Кучеряну, В.С. Косоруков, И.С. Стилиди***Скрининг фитокомпонентов для разработки онкопротектора . . . . . 32***Е.М. Трещалина, Г.Б. Смирнова, А.Ю. Кузеванова, С.Ш. Каршиева, М.В. Киселевский, А.В. Карпунин, М.А. Маслов, А.А. Алимов***Доклинические характеристики дуплексов миРНК в качестве таргетных адъювантов при злокачественном росте . . . . . 41***В.А. Полозкова, М.И. Трещалин, С.Г. Язерян, А.Е. Щекотихин, Э.Р. Переверзева***Оценка нейротоксичности антрафурана — нового противоопухолевого препарата из класса антрацендионов. . . . . 48***Ю.А. Полковникова, Д.Д. Бегинина, У.А. Тульская, А.С. Леньшин, А.А. Головина***Физико-химические и термические исследования твердых дисперсий дезлоратадина . . . . . 56***В.Ю. Рытченкова, С.В. Рытченков, Э.Ф. Степанова, Д.С. Юдин, С.В. Поройский***Разработка состава и характеристика геля ранозаживляющего действия с L-аргинином . . . . . 66***Д.А. Козин, Н.Ю. Кульбачевская, В.А. Балыков, З.С. Шпрах***Разработка и валидация биоаналитической методики определения ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии . . . . . 73**

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

*Г.А. Оборотов, А.А. Рудакова, М.А. Барышникова, М.В. Дмитриева, И.И. Краснюк***Оценка цитотоксического потенциала липосомального гемцитабина . . . . . 83**

## REVIEW

*Rustam N. Mustafin*

**Molecular genetic features of osteoarthritis immune mechanisms . . . . . 10**

## ORIGINAL REPORTS

*Polina O. Fedorova, Irina O. Chikileva*

**Evaluation of the effects of different interleukin combinations on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells . . . . . 22**

*Olga A. Bocharova, Andrey A. Aksyonov, Regina V. Karpova, Evgeny V. Bocharov, Natalia N. Kasatkina, Ilya V. Kazeev, Marina V. Utkina, Valerian G. Kucheryanu, Vyacheslav S. Kosorukov, Ivan S. Stilidi*

**Phytocomponents screening for oncoprotector development . . . . . 32**

*Helen M. Treshalina, Galina B. Smirnova, Anna Yu. Kuzevanova, Saida Sh. Karshieva, Mikhail V. Kiselevskiy, Alexander V. Karpukhin, Mikhail A. Maslov, Andrei A. Alimov*

**Preclinical characteristics of siRNA duplexes as targeted adjuvants in malignant growth . . . . 41**

*Vasilisa A. Polozkova, Michael I. Treshchalin, Sofiya G. Yazeryan, Andrey E. Shchekotikhin, Eleonora R. Pereverzeva*

**Evaluation of neurotoxicity of anthrafurin, a new antitumor drug from the anthracenediones class . . . . . 48**

*Yuliya A. Polkovnikova, Daria D. Beginina, Ulyana A. Tulskaia, Alexandr S. Lenshin, Anastasia A. Golovina*

**Physical-chemical and thermal studies of solid dispersions of desloratadine . . . . . 56**

*Viktoria Yu. Rytchenkova, Sergei V. Rytchenkov, Eleonora F. Stepanova, Dmitriy S. Yudin, Sergei V. Poroykiy*

**Development of the composition and characteristics of a wound-healing gel with L-arginine . . . . . 66**

*Dmitry A. Kozin, Natalya Yu. Kulbachevskaya, Vitaly A. Balykov, Zoya S. Shprakh*

**Development and validation of bioanalytical technique for the LCS-1269 assay by high-performance liquid chromatography . . . . . 73**

## BRIEF REPORT

*Grigory A. Oborotov, Anna A. Rudakova, Maria A. Baryshnikova, Maria V. Dmitrieva, Ivan I. Krasnyuk*

**Evaluation of the cytotoxic potential of liposomal gemcitabine . . . . . 83**

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-10-21>

# Молекулярно-генетические особенности иммунных механизмов остеоартроза

**Р.Н. Мустафин**

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3

**Контакты:** Рустам Наилевич Мустафин [ruji79@mail.ru](mailto:ruji79@mail.ru)

**Введение.** Остеоартроз (ОА) характеризуется гетерогенностью клинических проявлений, а в ряде случаев – тяжелым прогрессирующим течением. В связи с этим актуально определение новых молекулярных мишеней для лечения болезни.

**Цель исследования** – определить роль молекулярных, генетических и эпигенетических изменений при ОА, вовлеченных в патологические иммунные реакции, выявить специфические для болезни микроРНК в качестве потенциальных мишеней для таргетной терапии.

**Материалы и методы.** При подготовке обзора для поиска информации использованы научные платформы PubMed, Scopus, ResearchGate, RSCI. Поисковыми словами и словосочетаниями были следующие: osteoarthritis genes meta-analysis, osteoarthritis genes, miRNAs osteoarthritis.

**Результаты.** Получены данные о роли патологических иммунных реакций в механизмах развития ОА с изменением экспрессии инфильтрирующими суставы иммунными клетками 34 специфических генов, вовлеченных в функционирование иммунной системы. В клинических исследованиях определена ассоциация аллельных вариантов генов *C5AR1*, *FCGR2B*, *HLA-DR2*, *HLA-DR5*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4R*, *IL6*, *IL10*, *IL17*, *TYROBP*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9*, *TLR10*, участвующих в регуляции функционирования иммунной системы. Выявлены изменения экспрессии 11 специфических микроРНК, вовлеченных в воспалительные и дегенеративные процессы при ОА.

**Заключение.** Молекулярно-генетические исследования позволяют находить новые маркеры патологических иммунных реакций при ОА, которые могут быть использованы для лечения и предотвращения быстрого прогрессирования болезни, а также для проектирования таргетной терапии с применением в качестве мишеней специфических генов. Выявлена важная роль нарушений экспрессии генов, участвующих в функционировании иммунной системы, в патогенезе болезни. Ассоциированные с ОА микроРНК, вовлеченные в патогенез иммунных реакций, могут стать перспективными инструментами для таргетной терапии болезни. Анализ рассмотренных материалов свидетельствует о том, что использование микроРНК, воздействующих на сопричастные патогенезу ОА ретрозлементы, может стать основой не только для подавления прогрессирования патологии, но и для замедления процессов старения.

**Ключевые слова:** воспаление, иммунная реакция, микроРНК, остеоартроз

**Для цитирования:** Мустафин Р.Н. Молекулярно-генетические особенности иммунных механизмов остеоартроза. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):10–21.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-10-21>

## Molecular genetic features of osteoarthritis immune mechanisms

**Rustam N. Mustafin**

Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenin St., Ufa 450008, Russia

**Contacts:** Rustam Nailevich Mustafin [ruji79@mail.ru](mailto:ruji79@mail.ru)

**Background.** Osteoarthritis (OA) is characterized by heterogeneity of clinical manifestations and, in some cases, a severe progressive course. In this regard, it is important to identify new molecular targets for the treatment of the disease.

**Aim.** To determine the role of pathological immune processes, specific genetic and epigenetic changes in OA, identification of OA-specific microRNAs and potential targets for targeted therapy.

**Materials and methods.** To prepare the review, scientific platforms PubMed, Scopus, ResearchGate, RSCI were used to search for information. The search words and phrases were: “osteoarthritis genes meta-analysis”, “osteoarthritis genes”, “miRNAs osteoarthritis”.

**Results.** Data were obtained on the involvement of pathological immune reactions in the mechanism of OA with changes in the expression of 34 specific genes involved in the functioning of the immune system by immune cells infiltrating joints. Clinical studies have determined the association of allelic variants of *C5AR1*, *FCGR2B*, *HLA-DR2*, *HLA-DR5*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4R*, *IL6*, *IL10*, *IL17*, *TYROBP*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9*, *TLR10* genes, involved in the regulation of immune system functioning. Changes in the expression of 11 specific microRNAs involved in inflammatory and degenerative processes in OA were identified.

**Conclusion.** Molecular genetic studies make it possible to find new markers of pathological immune reactions in OA, the presence of which in patients can be used to determine methods of treating the disease to prevent rapid progression of the disease, as well as to design targeted therapy. An important role of disturbances in the expression of genes involved in the functioning of the immune system in the pathogenesis of the disease was identified. MicroRNAs associated with OA involved in the pathogenesis of immune changes may become promising tools for targeted therapy of OA. Analysis of the reviewed materials indicates that the use of microRNAs that affect retroelements involved in the pathogenesis of OA can become the basis not only for suppressing the progression of the pathology, but also for slowing down the aging process.

**Keywords:** inflammation, immune reaction, microRNA, osteoarthritis

**For citation:** Mustafin R.N. Molecular genetic features of osteoarthritis immune mechanisms. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):10–21. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-10-21>

## Введение

Остеоартроз (ОА), или остеоартрит, представляет собой самую распространенную гетерогенную группу заболеваний синовиальных суставов с развитием воспаления, вовлечением синовиальной оболочки [1] и ремоделированием субхондральной кости [2]. Характерно значительное увеличение частоты встречаемости болезни с возрастом, что свидетельствует о том, что ОА является ассоциированным со старением заболеванием и в основе его патогенеза могут лежать специфические для старения механизмы. Так, у взрослого населения 20 лет и старше ОА определяется в 10,7 % случаев, тогда как в 70 лет и старше – в 40 % [3]. Поскольку патогенез ОА до сих пор до конца не ясен, современные способы терапии не способны остановить прогрессирование болезни, что приводит к разрушению суставной поверхности и, как следствие, необходимости тотальной замены суставов. В 2019 г. проведен эпидемиологический анализ оперативного лечения суставов в Российской Федерации, согласно которому только за 1 год в нашей стране было выполнено 147 061 первичное эндопротезирование тазобедренного и коленного суставов [4]. Для определения перспективных путей терапии ОА необходимо определить ключевые пути патогенеза болезни с возможными молекулярными мишенями на генетическом и эпигенетическом уровнях. Поскольку ОА ассоциирован со старением [3] и характеризуется воспалительными процессами в суставе [1], важно остановиться на иммунопатологических механизмах болезни, так как при старении дисбаланс в иммунной системе приводит к аутоиммунному асептическому воспалению и гиперпродукции интерферона (IFN) [5].

Причина воспалительных процессов при старении – гиперактивация ретроэлементов (РЭ) [5], которые являются также драйверами самого процесса старения организма человека [6]. Для старения характерно истощение гистоновой деацетилазы – сиртуина 6 (Sirt6), в норме подавляющей экспрессию РЭ [7]. Снижение концентрации Sirt6 выявляется также при синовиальном воспалении при ОА. В результате индуцируется поляризация М1-макрофагов с высвобождением в них провоспалительных цитокинов. Вместе с тем восстановление активности Sirt6 способствует улучшению состояния хряща и останавливает прогрессирование ОА [1]. М1-макрофаги классически активируются под влиянием IFN- $\gamma$  и toll-подобных рецепторов (TLR), в результате чего они секретируют интерлейкины (IL) -1 $\beta$ , -6, -12, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), активные формы кислорода и индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS) [8].

Как при старении, так и при ОА снижается экспрессия Круппель-подобных транскрипционных факторов – KLF2 и KLF4, контролирующих воспалительные реакции. KLF2 и KLF4 в норме обеспечивают защиту от неконтролируемой деградаци и воспаления за счет активации генов основных компонентов хряща и экстрацеллюлярного матрикса, таких как *SOX9* и *COL2A1*, а также путем подавления катаболических и воспалительных генов *MMP13*, *iNOS*, *IL6* [9]. Данные изменения обусловлены нарушением регуляции эпигенетических факторов (к которым относятся модификации гистонов с изменением структуры хроматина, метилирование ДНК и РНК-интерференция с помощью некодирующих РНК) [10]. В то же время драйверами эпигенетической регуляции [11] являются РЭ,

которые служат также эволюционными источниками микроРНК [12] и длинных некодирующих РНК [13]; РЭ – это специфические локусы ДНК (транспозоны), характеризующиеся перемещением в новые локусы генома с помощью механизма «копирования и вставки». Транспозоны составляют 45 % генома человека [12]. При этом основную часть из них занимают РЭ. К ним относятся автономные LINE (длинные диспергированные ядерные элементы) и HERV (эндогенные ретровирусы человека), неавтономные SVA и SINE (короткие диспергированные повторы) [11]. На рис. 1 представлены ассоциированные со старением сложные молекулярные, генетические и эпигенетические процессы, вызывающие дисбаланс в иммунной системе и развитие ОА.

**Цель исследования** – определить роль молекулярных, генетических и эпигенетических изменений при ОА, вовлеченных в патологические иммунные реакции, выявить специфические для болезни микроРНК в качестве потенциальных мишеней для таргетной терапии.

## Материалы и методы

При подготовке обзора для поиска информации использованы научные платформы PubMed, Scopus, ResearchGate, RSCI. Поисковыми словами и словосочетаниями были следующие: osteoarthritis genes meta-analysis, osteoarthritis genes, miRNAs osteoarthritis. Глубина поиска составила 20 лет с ретроспективой до 2002 г. Однако сделан акцент преимущественно на публикации последних 5 лет.

## Результаты и обсуждение

Анализ литературы показал, что в развитие ОА вовлечены иммунопатологические механизмы, о чем свидетельствуют данные о вовлеченности IFN, специфических генов и микроРНК, участвующих в регуляции иммунной системы.

### Роль иммунопатологических процессов в развитии остеоартроза

При ОА в костно-хрящевой единице происходят пролиферация хондроцитов в глубоких зонах, потеря

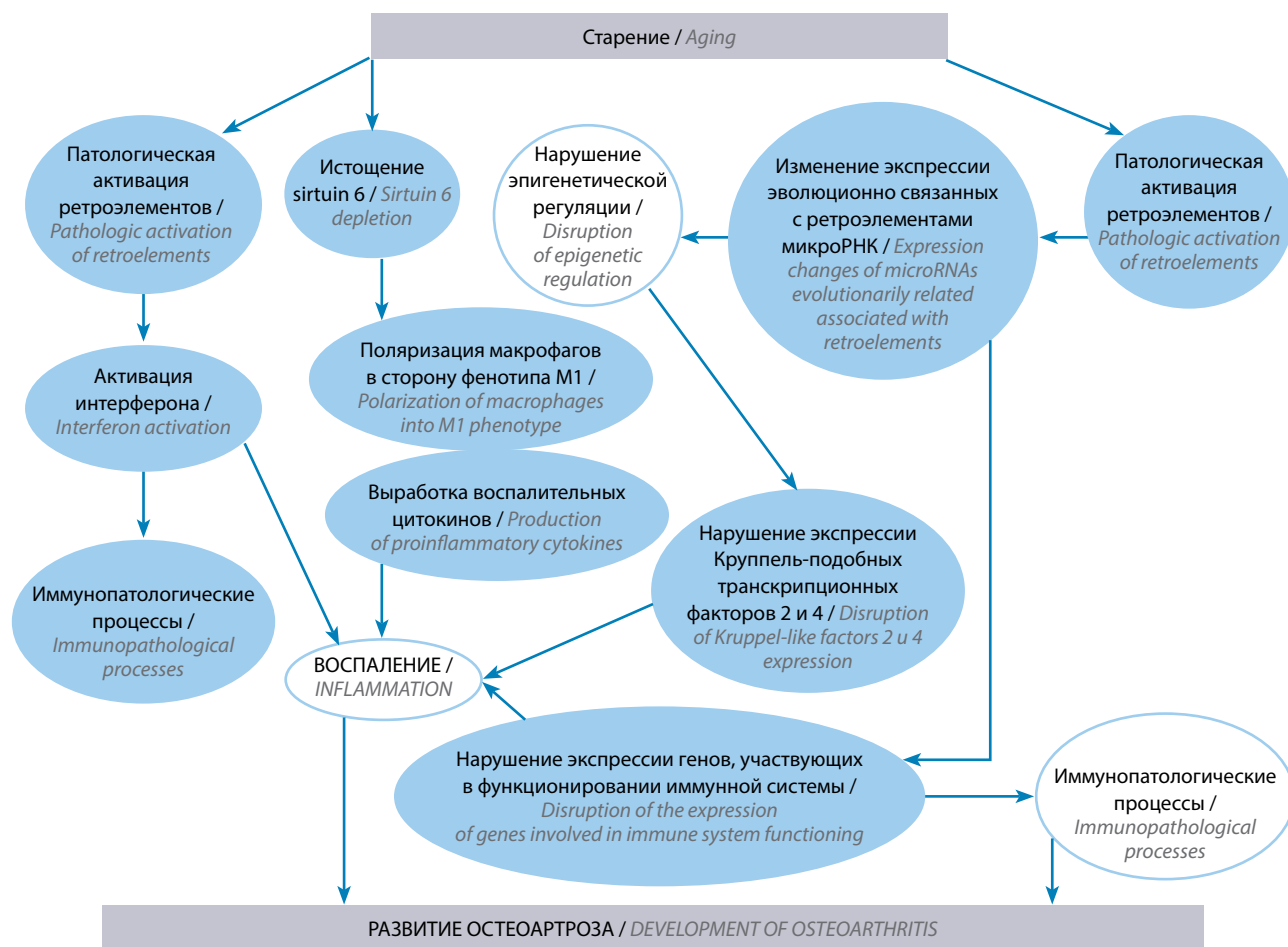


Рис. 1. Схема взаимосвязи иммунопатологических изменений при старении с развитием остеоартроза

Fig. 1. Scheme of the relationship between immunopathological changes during aging and the development of osteoarthritis

внечелочного матрикса и хондроцитов в поверхностной зоне, васкуляризация и вращение нейронов через границу между кальцинированным и некальцинированным хрящом, ремоделирование субхондральной кости (со склерозом, кистами и остеофитами) [14]. Причиной дегенерации хряща при ОА является в первую очередь воспаление, вследствие которого происходит разрушение межклеточного матрикса при синовиальной активации клеток иммунной системы и высвобождении провоспалительных цитокинов в синовиальную жидкость [15]. У пациентов с ОА обнаружена аномальная экспрессия галектинов, семейства гликансвязывающих белков, являющихся важным регулятором врожденного и адаптивного иммунного ответа и участвующих в инвазии, миграции, адгезии и пролиферации клеток. Данные вещества секретируются на повышенном уровне при аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка, ревматоидный артрит (РА), системная склеродермия [16].

У 15 % больных ОА в крови определены аутоантитела к Hcy-A1AT (homocysteinylated alpha 1 antitrypsin), которые специфичны для пациентов с серопозитивным (87,1 %) и серонегативным (75,7 %) РА. У здоровых людей данные аутоантитела не определяются (0,0 %) [17]. Проведенный в 2023 г. мультиомный анализ показал плеiotропный эффект экспрессии гена главного комплекса гистосовместимости иммунной системы *HLA-DPB2* в развитии ОА коленного сустава, опосредованного изменением метилирования данного гена, что также свидетельствует о роли иммунопатологических процессов в патогенезе болезни [18]. Нужно отметить, что для больных РА также определено изменение экспрессией *HLA-DPB2*, которое коррелировало с тяжестью клинической картины заболевания [19]. Дефицит витамина D<sub>3</sub>, приводящий к дисбалансу взаимодействий между следующими Т-хелперами (Th): Th1/Th17 и Th2, Th17/Th reg, способствует развитию как ОА, так и аутоиммунных процессов [20]. Провоспалительный цитокин TNF-α способствует прогрессированию ОА. В связи с этим эндогенный антагонист TNF-α програнулин замедляет прогрессирование ОА [21]. При ОА, подобно аутоиммунным заболеваниям, отмечена роль повышенной экспрессии IL-17 [22].

О роли иммунопатологических процессов в развитии ОА свидетельствует влияние IFN на ОА различными путями, в том числе за счет активации протеинкиназы R (PKR), вовлеченной в воспаление. В экспериментах обработка суставного хряща IFN-γ вызывала его дегенерацию, опосредованную PKR с усилением экспрессии медиаторов воспаления IL-6 и TNF-α, матриксной металлопротеиназы MMP-13 и транскрипционных факторов PKR и STAT1 [2]. В плазме крови и синовиальной жидкости больных

ОА определено достоверное повышение концентрации индуцибельного IFN-γ белка IP-10 по сравнению со здоровой группой контроля [23]. С риском ОА ассоциирован полиморфизм гена *TIM3*, вовлеченного в иммунный ответ и усиливающего экспрессию IFN-γ CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами [24]. В тканях суставов с ОА происходит усиленный синтез белка STING (stimulator of interferon genes), который стимулирует выработку IFN, MMP (matrix metalloproteinase) 13, ADAMTS5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5), подавляет экспрессию агрегана, коллагена II, способствует апоптозу и старению хондроцитов за счет активации сигнального каскада NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [25]. В патогенезе аутоиммунных болезней также играют роль IFN [26, 27] и гены интерфероновой реакции [28], что является дополнительным свидетельством роли иммунопатологических процессов в патогенезе ОА.

#### Ассоциация генов с иммунными реакциями при остеоартрозе

Молекулярно-генетические исследования определяют изменения экспрессии специфических генов в тканях пораженных ОА суставов клетками иммунной системы. Важную роль в патогенезе ОА играют синовиальные макрофаги. В исследовании, посвященном определению поиска потенциальных генов риска инфильтрации хряща иммунными клетками при ОА, по сравнению с нормальным контролем, показано достоверное изменение экспрессии иммунными клетками сустава генов *GPR137B*, *HLA-DMB*, *PTGS1* [29], *FZD7*, *IRAK3*, *KDELR3*, *PHC2*, *RHOB*, *RNF170*, *SOX13*, *ZKSCAN4* [30], *IRAK3* [31], *DUSP1*, *JUN*, *MYC*, *NFKBIA* [32], *EDNRB*, *IL1R1*, *PGF*, *SCD1*, *TNFSF11* [33]. В нескольких исследованиях выявлена роль ассоциированных с иммунной инфильтрацией и вовлеченных в патогенез ОА генов *KLF9*, *EPYC* [15], *GREM1*, *NRP1*, *VEGFA*, *FYN*, *IL6R* [34], *GABARAPL1*, *TNFAIP3*, *ARNTL*, *JUN* [35], *CDKN1A*, *DDIT3*, *MAP1LC3B*, *MYC* [36], *LPCAT3*, *PGD* [37], *BCL6*, *EPHA3*, *MCL1*, *PIM1*, *SLC16A7* [38], генов, кодирующих белки GITRL (glucocorticoid-induced TNF receptor ligand), CEACAM-1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1), FSH (follicle-stimulating hormone), EG-VEGF (endocrine gland-derived endothelial growth factor), FGF-4 (fibroblast growth factor 4), PIGF (placental growth factor), цистатин ЕМ и нейротрофин-4 [39] также имеют значение в иммунопатологических реакциях.

В табл. 1 описана функция генов, экспрессия которых достоверно изменена при ОА, участвующих в функционировании иммунной системы и оказывающих влияние на патологические иммунные реакции. Анализ представленных в таблице данных

Таблица 1. Ассоциированные с остеоартрозом (ОА) гены, влияющие на иммунные реакции

Table 1. Osteoarthritis (OA)-associated genes affecting immune responses

Ген Gene	Белковый продукт гена, функция Protein product of the gene and its function	Изменение экспрес- сии при ОА [ссылка на публикацию] Expression changes in OA [publication link]
<i>C5AR1</i>	Рецептор анафилотоксина с5а, экспрессируемый иммунными клетками, химический аттрактант и медиатор воспаления Anaphylotoxin receptor C5a expressed by immune cells, a chemical attractant and inflammatory mediator	Повышение [40] Increase [40]
<i>CDKN1A</i>	Ингибитор циклинзависимой киназы 1А, регулирует репликацию ДНК в S-фазу и участвует в восстановлении поврежденной ДНК, влияет на аутофагию Inhibitor of cyclin-dependent kinase 1A, regulates DNA replication in S-phase and is involved in the repair of damaged DNA, affects autophagy	Снижение [36] Decrease [36]
<i>CEACAM-1</i>	Иммунный регулятор Т-лимфоцитов, подавляет воспаление Immune regulator of T-lymphocytes, suppresses inflammation	Снижение [39] Decrease [39]
<i>CTLA4</i>	Клеточный рецептор иммуноглобулинов Cellular immunoglobulin receptor	Повышение [39] Increase [39]
<i>DUSP1</i>	Ингибирует пролиферацию и воспалительный ответ, подавляет матриксную металлопротеиназу 13 Inhibits proliferation and inflammatory response, suppresses matrix metalloproteinase 13	Снижение [32] Decrease [32]
<i>EDNRB</i>	Рецептор эндотелина типа В, связанный с G-белком, который активирует фосфатидилинозитол-кальциевую систему Endothelin receptor type B, a G protein-coupled receptor that activates the phosphatidylinositol-calcium system	Повышение [33] Increase [33]
<i>EG-VEGF</i>	Ангиогенный фактор, способствует ангиогенезу и воспалению сустава Angiogenic factor, promotes angiogenesis and joint inflammation	Повышение [39] Increase [39]
<i>EPYC</i>	Способствует инфильтрации сустава плазматическими, тучными клетками и регуляторными Т-лимфоцитами Promotes joint infiltration by plasma cells, mast cells and regulatory T-lymphocytes	Повышение [15] Increase [15]
<i>FGF-4</i>	Ангиогенный фактор, способствует ангиогенезу и воспалению сустава Angiogenic factor, promotes angiogenesis and joint inflammation	Повышение [39] Increase [39]
<i>FSH</i>	Фолликулостимулирующий гормон, активирующий воспаление в суставе Follicle stimulating hormone, stimulating joints inflammation	Повышение [39] Increase [39]
<i>HLA-DMB</i>	Белки главного комплекса гистосовместимости класса II, DM beta Major histocompatibility complex class II proteins, DM beta	Повышение [38] Increase [38]
<i>JUN</i>	Транскрипционный фактор, стимулирующий апоптоз иммунных клеток Transcription factor that stimulates apoptosis of immune cells	Снижение [32, 35] Decrease [32, 35]
<i>IL1B</i>	Провоспалительный цитокин, вырабатываемый иммунными клетками Proinflammatory cytokine produced by immune cells	Повышение [40] Increase [40]
<i>IL1R1</i>	Рецептор интерлейкина 1, передача провоспалительных сигналов Interleukin 1 receptor, proinflammatory signaling	Повышение [33] Increase [33]
<i>IL6R</i>	Рецептор интерлейкина 6, передача провоспалительных сигналов Interleukin 6 receptor, proinflammatory signaling	Повышение [34] Increase [34]
<i>IL10</i>	Противовоспалительный цитокин, вырабатываемый иммунными клетками Anti-inflammatory cytokine produced by immune cells	Повышение [40] Increase [40]
<i>IRAK3</i>	Ассоциированная с рецептором интерлейкина 1 киназа Interleukin-1 receptor-associated kinase	Повышение [30] Increase [30]
<i>KLF2</i>	Круппел-подобный транскрипционный фактор, ингибирующий воспаление Kruppel-like inflammation inhibitory transcription factor	Снижение [9] Decrease [9]
<i>KLF4</i>	Круппел-подобный транскрипционный фактор, ингибирующий воспаление Kruppel-like inflammation inhibitory transcription factor	Снижение [9] Decrease [9]

Окончание табл. 1  
End of table 1

Ген Gene	Белковый продукт гена, функция Protein product of the gene and its function	Изменение экспрес- сии при ОА [ссылка на публикацию] Expression changes in OA [publication link]
<i>KLF9</i>	Круппель-подобный транскрипционный фактор, способствующий инфильтрации ткани сустава НК-клетками и CD4-Т-лимфоцитами Kruppel-like transcription factor promoting joint tissue infiltration by NK cells and CD4-T lymphocytes	Снижение [15] Decrease [15]
<i>MAP1LC3B</i>	Субъединица белков, связанных с микротрубочками, 1А и 1В, участвует в аутофагии Microtubule-associated protein 1A and 1B subunit, involved in autophagy	Снижение [36] Decrease [36]
<i>MCL1</i>	Регулятор апоптоза MCL1, необходим для выживания фибробластов, макрофагов и лимфоцитов Apoptosis regulator MCL1, essential for the survival of fibroblasts, macrophages and lymphocytes	Снижение [38] Decrease [38]
<i>MYC</i>	Подавляет пролиферацию клеток и стимулирует их апоптоз, ингибирует интерлейкин 1β, фактор некроза опухоли α, интерлейкин 6, матриксную металлопротеиназу 13 Suppresses cell proliferation and stimulates their apoptosis, inhibits interleukin-1β, tumor necrosis factor α, interleukin-6, matrix metalloproteinase 13	Снижение [32] Decrease [32]
<i>NFKBIA</i>	Ингибитор ядерного фактора κВ, предотвращает образование комплексов NFκB/REL, связанных с воспалением Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells inhibitor, prevents the formation of NFκB/REL complexes associated with inflammation	Снижение [32] Decrease [32]
<i>PGF</i>	Член подсемейства фактора роста эндотелия сосудов, способствует ангиогенезу Member of the vascular endothelial growth factor subfamily, promotes angiogenesis	Повышение [33] Increase [33]
<i>PIGF</i>	Ангиогенный фактор, способствует ангиогенезу и воспалению сустава Angiogenic factor, promotes angiogenesis and joint inflammation	Повышение [39] Increase [39]
<i>PIM1</i>	Ключевой регулятор апоптоза, стимулирует дифференцировку и пролиферацию Key regulator of apoptosis, stimulates differentiation and proliferation	Снижение [38] Decrease [38]
<i>RHOV</i>	Малая везикулярная ГТФаза RhoV, активирует интерлейкин 1β, липополисахарид, фактор некроза опухоли α Small vesicular gtpase rhov, activates interleukin-1β, lipopolysaccharide, tumor necrosis factor α	Повышение [30] Increase [30]
<i>SCD1</i>	Способствует инфильтрации моноцитов, активированных CD4- и γδТ-лимфоцитами, лежащими в основе воспалительного микроокружения Promotes infiltration of monocytes, activated CD4 and γδT lymphocytes, which underlie the inflammatory microenvironment	Повышение [33] Increase [33]
<i>SOX13</i>	Аутоиммунный антиген, модулирующий воспалительный ответ Autoimmune antigen that modulates inflammatory response	Повышение [30] Increase [30]
<i>TNFAIP3</i>	Индуктируемый фактором некроза опухоли белок цинковых пальцев, редактирует убиквитин и участвует в иммунных и воспалительных реакциях Tumor necrosis factor-induced zinc finger protein, edits ubiquitin and is involved in immune and inflammatory responses	Снижение [35] Decrease [35]
<i>TNFRSF18</i>	Индуктируемый глюкокортикоидами лиганд рецептора фактора некроза опухоли, регулятор воспаления Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand, regulator of inflammation	Снижение [39] Decrease [39]
<i>TNFSF11</i>	Член семейства фактора некроза опухоли, играет ключевую роль в продукции активированных В- и Т-лимфоцитов и инфильтрации ими тканей, индуцирует провоспалительную реакцию Member of the tumor necrosis factor family, plays key role in the production of activated B and T lymphocytes and their tissue infiltration, induces a proinflammatory response	Повышение [33] Increase [33]
<i>VEGFA</i>	Фактор роста эндотелия сосудов, стимуляция воспаления Vascular endothelial growth factor, inflammation stimulation	Повышение [34] Increase [34]

свидетельствует о том, что в инфильтрирующих суставах иммунных клетках при ОА снижается экспрессия участвующих в иммунных реакциях генов *CDKN1A* [36], *CEACAM-1* [39], *DUSP1* [32], *JUN* [32, 35], *KLF2*, *KLF4* [9], *KLF9* [15], *MAP1LC3B* [36], *MCL1* [38], *MYC*, *NFKBIA* [32], *PIM1* [38], *TNFAIP3* [35], *TNFRSF18* [39] и оказывающих противовоспалительный эффект, а также повышается уровень провоспалительных белков, продуктов генов *C5AR1* [40], *CTLA4* [39], *EDNRB* [33], *EG-VEGF* [39], *EPYC* [15], *FGF-4*, *FSH* [39], *HLA-DMB* [38], *IL1B* [40], *IL1R1* [33], *IL4R*, *IL6R* [34], *IL10* [40], *IRAK3* [30], *PGF* [33], *PIGF* [39], *RHOB* [30], *SCD1* [33], *SOX13* [30], *TNFSF11* [33], *VEGFA* [34]. Данные молекулы могут быть потенциальными мишенями для таргетной терапии болезни, в частности при местном введении в пораженные ОА суставы. Показано также повышение экспрессии иммунными клетками в суставах при ОА ангиогенных факторов EG-VEGF, PIGF, FGF4, которые способствуют прогрессированию ОА за счет привлечения иммунных клеток в пораженные воспалением суставы, способствуя таким образом воспалению. Проектирование генных сетей в работе 2023 г. В. Zhang и соавт. показало возможные перспективы таргетного воздействия на экспрессию вовлеченных в иммунные реакции в пораженных ОА суставах. Так, матричная РНК (мРНК) гена, кодирующего MYC, является мишенью для miR-510-3p, miR-5000-3p, miR-1294, miR-1827, miR-548au-3p. На мРНК гена *JUN* нацелены miR-4749-3p, miR-6734-3p, miR-3156-3p, miR-6507-3p [41]. Данные гены были охарактеризованы низкой экспрессией, поэтому использование антагонистов указанных микроРНК может стать основой для таргетной терапии воспалительных процессов в суставах при ОА. Описана роль в снижении экспрессии *DUSP1* (что способствует воспалению и дегенерации хряща) miR-101, которая может служить одним из потенциальных инструментов в таргетной терапии ОА [42]. Ингибирующее действие на экспрессию гена *KLF9* оказывает miR-218-5p, которая определяется в высокой концентрации в синовиальной оболочке суставов больных РА и может стать потенциальным инструментом в лечении ОА [43]. Для разработки наиболее эффективных методов эпигенетического воздействия на болезнь проведен анализ научной литературы о достоверно ассоциированных с развитием ОА специфических микроРНК.

Дополнительным подтверждением роли патологических иммунных реакций в патогенезе ОА, согласно приведенным результатам молекулярно-генетических исследований, могут служить данные об ассоциации с РА генов, экспрессия которых достоверно изменена при ОА. Так, с РА ассоциированы полиморфные варианты генов *DUSP1* [42], *EDNRB* [44], *HLA-DMB* [45], *IL1B* [46], *IL1R* [47], *IL10* [48],

*RHOB* [49], *SOX13* [50], *TNFAIP3* [51], *IL6R* [52], *CTLA4* [53]. Помимо изменений экспрессии специфических генов клетками иммунной системы, о роли иммунопатологических процессов в патогенезе ОА свидетельствуют данные об ассоциации с болезнью полиморфных генов, вовлеченных в иммунные реакции. Так, с инфильтрацией суставов ассоциированы гены *C5AR1*, *FCGR2B*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TYROBP* [40]. Была выявлена достоверная ассоциация с риском развития ОА аллельных вариантов генов провоспалительных цитокинов — *IL1RN* [54], *IL6* [55], *IL17* [56], рецептора интерлейкина *IL4R* [57], главного комплекса гистосовместимости *HLA-DR2* и *HLA-DR5* [58]. Описана семья с ранним началом и аутосомно-доминантным типом наследования ОА, обусловленным миссенс-мутацией (р. Asn104Asp) в гене *RIPK2*. Белковый продукт данного гена — рецептор-взаимодействующая протеинкиназа 2, передающая сигналы провоспалительного иммунного ответа. Миссенс-мутация приводит к гиперактивации белка и повышенной способности индуцировать иммунный ответ и путь NF-κB [59]. Описана достоверная ассоциация с развитием ОА полиморфизмов генов *TLR* (участвующих в функционировании иммунной системы) — *TLR3* [60], *TLR4*, *TLR7* [61], *TLR9* [62], *TLR10* [63].

#### Роль микроРНК в развитии иммунопатологических изменений остеоартроза

МикроРНК являются эпигенетическими факторами, к которым относятся также длинные некодирующие РНК, метилирование ДНК и модификации гистонов [11]. Биоинформационный анализ ассоциированных с ОА особенностей экспрессии микроРНК показал достоверное повышение уровней miR-16-5p, miR-211-5p, miR-23b-3p, miR-27b-3p и снижение уровней miR-149-5p и miR-25-3p [64]. Повышенная экспрессия miR-16-5p определена также в образцах плазмы крови больных РА по сравнению с контролем, что свидетельствует о роли данной микроРНК в аутоиммунных процессах [65]. MiR-16-5p оказывает регуляторное воздействие на экспрессию генов матричных металлопротеиназ *MMP8*, *MMP1*, протеинкиназу ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) [66]. MiR-23b ассоциирована с воспалением и аутоиммунными болезнями. Микрочиповый анализ микроРНК в фибробластоподобных синовиоцитах показал повышенную экспрессию miR-23b у пациентов с РА, что было подтверждено количественной полимеразной цепной реакцией. Мишенями miR-23b являются гены *Marcks1-1* (кодирует белок, влияющий на адгезивные соединения и регуляцию цитоскелета), *NF-κB* (транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию генов иммунного ответа), а также мРНК генов воспалительных факторов

эндотелиальных клеток [67]. В периферических мононуклеарах больных РА определена сниженная экспрессия miR-25-3p [68], которая регулирует экспрессию *VEGFR2*, *ZO-1*, *Claudin5* в эндотелиоцитах за счет целевого воздействия на *KLF2* и *KLF4*, способствуя таким образом патологическому ангиогенезу [69]. MiR-149-5p и miR-let-7c-5p подавляют транскрипцию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 у больных ОА и РА по сравнению с нормальным контролем. Противовоспалительные лекарства индометацин, целекоксиб и дексаметазон, а также ибупрофен и метотрексат подавляли продукцию провоспалительных цитокинов за счет усиления экспрессии miR-149-5p и miR-let-7c-5p [70].

Метаанализ 2023 г. показал, что наибольшее количество исследований ОА проведено с использованием суставного хряща, где чаще всего определялись активация miR-146a-5p, miR-34a-5p и снижение экспрессии miR-127-5p, miR-140-5p [71]. В то же время в проведенном в 2018 г. метаанализе продемонстрировано, что уровни miR-146a значительно выше у больных РА по сравнению со здоровыми лицами контрольной группы [72]. Определена важная роль miR-146 в развитии ювенильного идиопатического артрита и аутоиммунного увеита [73]. MiR-146a является первичным регулятором иммунного ответа и участвует в патогенезе РА. В экзосомах, полученных из мезенхимальных стволовых клеток и трансдуцированных по miR-146a, экспрессию повышают гены *Fox-P3*, *IL10*, *TGF- $\beta$*  [74]. При РА определяется также значительное снижение экспрессии miR-140 по сравнению с контролем. Мишенью данной микроРНК являются мРНК генов *Smad3*, *ADAMTS-5*, *HDAC4*. Кроме того, miR-140 воздействует на деацетилазу гистонов HDAC4, приводя к гиперацетилированию матриксного белка с регуляцией развития и гомеостаза хряща [75]. Было показано, что miR-127-5p способствует хондрогенезу за счет регуляции дифференцировки хондробластов [76], а miR-34a-5p способствует образованию провоспалительного фенотипа M1 макрофагов [77].

Сходное изменение экспрессии miR-140, miR-146a, miR-149, miR-16, miR-13b, miR-25, характерных для ОА, при РА свидетельствует о наличии общих эпигенетических механизмов развития ОА и роли аутоиммунных процессов в патогенезе ОА. В отличие от ассоциации с экспрессией специфических белок-кодирующих генов, одинаковые изменения уровней которых определены только для части генов, идентичный характер ассоциации микроРНК может быть обусловлен наличием множества мишеней данных молекул (микроРНК регулируют экспрессию мРНК множества различных генов). Кроме того, микроРНК обладают потенциалом вызывать перестройку стволовых клеток в дифференцированные с активацией регенерации хрящевой ткани, что перспективно

для клинической медицины. В экспериментах на крысах была показана регенерация хряща за счет подавления старения при доставке микроРНК miR-29b-5p в суставы с помощью синовиальных стволовых клеток, которые дифференцировались в хондроциты [78]. При ОА снижение экспрессии miR-17 способствует прогрессированию болезни. В экспериментах на мышах индукция miR-17 фактором дифференцировки роста или введение самой miR-17 предотвращало ОА путем одновременного воздействия на экспрессию *NOS2* (синтаза оксида азота 2), *ADAMTS5* (аггреканиз-2), *MMP3*, *MMP13* (металлопептидазы 3/13) [79].

В табл. 2 представлены описанные микроРНК и механизм их действия, влияющий на развитие ОА. Как видно из данных таблицы, микроРНК, экспрессия которых снижена при ОА, обладают потенциалом восстановления ткани сустава (miR-127-5p [76], miR-140-5p [75]) и подавления воспаления в нем (miR-let-7c-5p, miR-149-5p [70], miR-25 [69]), поэтому данные микроРНК или их миметики можно использовать в качестве инструментов для таргетной терапии ОА. В то же время микроРНК, экспрессия которых повышена при ОА, способствуют прогрессированию ОА за счет стимуляции воспаления (miR-146a [74], miR-23b [67], miR-34a-5p [77]), апоптоза (miR-211-5p [80]) и вызывающих деградацию хряща молекул (miR-16-5p [66]). Такие микроРНК могут быть использованы в качестве мишеней для производства антисмысловых олигонуклеотидов и подавления их экспрессии с целью подавления прогрессирования ОА.

### Заключение

Анализ научной литературы подтверждает роль иммунопатологических процессов в развитии ОА на молекулярном, генетическом и эпигенетическом уровнях. Показана роль поляризации M1-макрофагов, инфильтрации синовиальной оболочки суставов клетками иммунной системы с изменением экспрессии ими генов, влияющих на иммунные реакции. У пациентов с ОА выявлены аутоантитела к Hsp- $\alpha$ 1AT, характерные для аутоиммунных болезней, а также аномальная экспрессия галектинов, HLA-DPB2, TNF- $\alpha$ , IFN, протеинкиназы PKR, индуцибельного IFN- $\gamma$  белка IP-10, стимулирующего выработку IFN белка STING. Выявлена аномальная экспрессия клетками иммунной системы, инфильтрирующими пораженные ОА суставы, 34 вовлеченных в регуляцию иммунных реакций генов, которые могут быть использованы в качестве мишеней для таргетной терапии ОА. Из них гены *DUSP1*, *EDNRB*, *HLA-DMB*, *IL1B*, *IL1R*, *IL10*, *RHOV*, *SOX13*, *TNFAIP3*, *IL6R*, *CTLA4* оказались также вовлечены в развитие ревматоидного артрита. Согласно клиническим исследованиям, с ОА ассоциированы аллельные варианты генов *C5AR1*,

Таблица 2. Изменения экспрессии специфических микроРНК при остеоартрозе (ОА)

Table 2. Changes in the expression of specific microRNAs in osteoarthritis (OA)

МикроРНК MiRNA	Изменение экспрессии при ОА [ссылка на публикацию] Expression changes in OA [publication link]	Механизм действия микроРНК [ссылка на публикацию] Mechanism of the microRNA action [publication link]
miR-let-7c-5p	Снижение [70] Decrease [70]	Подавляет экспрессию генов <i>TNF-α</i> , <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> [70] Inhibits the expression of <i>TNF-α</i> , <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> genes [70]
miR-17	Снижение [79] Decrease [79]	Регулирует экспрессию генов <i>NOS-2</i> , <i>ADAMTS5</i> , <i>MMP3</i> , <i>MMP13</i> [79] Regulates the expression of <i>NOS-2</i> , <i>ADAMTS5</i> , <i>MMP3</i> , <i>MMP13</i> genes [79]
miR-127-5p	Снижение [71] Decrease [71]	Способствует хондрогенезу за счет регуляции дифференцировки хондробластов [76] Promotes chondrogenesis by regulating chondroblast differentiation [76]
miR-140-5p	Снижение [71] Decrease [71]	Ингибируют мРНК генов <i>Smad3</i> , <i>ADAMTS-5</i> , <i>HDAC4</i> [75] Inhibit mRNA of <i>Smad3</i> , <i>ADAMTS-5</i> , <i>HDAC4</i> genes [75]
miR-146a	Повышение [71] Increase [71]	Регулируют экспрессию генов <i>Fox-P3</i> , <i>IL10</i> , <i>TGF-β</i> [74] Regulate the expression of <i>Fox-P3</i> , <i>IL10</i> , <i>TGF-β</i> genes [74]
miR-149-5p	Снижение [64] Decrease [64]	Подавляет экспрессию генов <i>TNF-α</i> , <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> [70], <i>IL10</i> , <i>TGF-β</i> [74] Suppresses the expression of <i>TNF-α</i> , <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> [70], <i>IL10</i> , <i>TGF-β</i> genes [74]
miR-16-5p	Повышение [64] Increase [64]	Регулирует экспрессию генов <i>MMP8</i> , <i>MMP1</i> , <i>ERK1/2</i> [66] Regulates the expression of <i>MMP8</i> , <i>MMP1</i> , <i>ERK1/2</i> genes [66]
miR-211-5p	Повышение [64] Increase [64]	Оказывает влияние на стресс эндоплазматического ретикулума, апоптотические гены путем воздействия на PKR-подобную ER-киназу [80] Affects endoplasmic reticulum stress apoptotic genes by acting on PKR-like ER kinase [80]
miR-23b	Повышение [64] Increase [64]	Регулирует экспрессию генов <i>Marcksl-1</i> , <i>NF-κB</i> [67] Regulates the expression of <i>Marcksl-1</i> , <i>NF-κB</i> genes [67]
miR-25	Снижение [64] Decrease [64]	Подавляет экспрессию <i>KLF2</i> и <i>KLF4</i> [69] Inhibits the expression of <i>KLF2</i> and <i>KLF4</i> [69]
miR-34a-5p	Повышение [71] Increase [71]	Влияет на дифференцировку макрофагов в фенотипе M1 [77] Affects the differentiation of macrophages into M1 phenotype [77]

*FCGR2B*, *HLA-DR2*, *HLA-DR5*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4R*, *IL6*, *IL10*, *IL17*, *TYROBP*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9*, *TLR10*, участвующих в регуляции функционирования иммунной системы. Анализ полученных данных свидетельствует о важной роли изменений экспрессии генов, вовлеченных в функционирование иммунной системы, в патогенез ОА, что подчеркивает необходимость противовоспалительной терапии болезни и возможного использования иммунокоррекции. Исследования роли эпигенетических факторов в развитии ОА показали снижение экспрессии микроРНК, подавляющих воспалительные процессы (miR-let-7c-5p, miR-149-5p, miR-25), а также повышение уровней микроРНК, стимулирующих воспаление (miR-146a, miR-23b, miR-34a-5p). Полученные данные, а также сходное изменение экспрессии 6 микроРНК при ОА и ревматоидном артрите свидетельствуют о роли дисбаланса эпигенетической регуляции иммунной системы в развитии ОА. Описанные микроРНК, экс-

прессия которых достоверно нарушена в пораженных ОА суставах, являются потенциальными мишенями для таргетной терапии болезни. Анализ рассмотренных материалов свидетельствует о том, что увеличение частоты встречаемости ОА при старении обусловлено патологической активацией РЭ, являющихся источниками микроРНК. Перспективным путем исследования иммунопатогенеза ОА и роли системной хронической воспалительной реакции пожилых является анализ вовлеченности специфических РЭ, патологическая активация которых ведет к прогрессированию ОА. При старении активированные РЭ ведут к индукции IFN и асептическому воспалению различных органов и тканей с их последующей дегенерацией, включая синовиальные суставы. Можно предположить, что в зависимости от наследственной предрасположенности (индивидуальные особенности полиморфизмов РЭ) у людей могут активироваться специфические РЭ, участвующие именно в развитии ОА.

Экспрессия данных РЭ может происходить также в самих суставах, усугубляя воспаление и прогрессирование патологии. Именно поэтому воздействие на такие РЭ с помощью микроРНК и регуляции эпигенетических факторов может не только остановить патологические

процессы в суставах, но также замедлить старение. Одним из путей такой терапии может стать использование пептидов, образуемых при трансляции некодирующих РНК и способных оказывать эпигенетическое воздействие на специфические гены, микроРНК и РЭ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Chen J., Chen S., Cai D. et al. The role of Sirt6 in osteoarthritis and its effect on macrophage polarization. *Bioengineered* 2022;13(4):9677–89. DOI: 10.1080/21655979.2022.2059610
- Gilbert S.J., Blain E.J., Mason D.J. Interferon-gamma modulates articular chondrocyte and osteoblast metabolism through protein kinase R-independent and dependent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;32:101323. DOI: 10.1016/j.bbrep.2022.101323
- Vos T., Flaxman A.D., Naghavi M. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2163–96. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61729-2
- Серда А.П., Кочиш А.А., Черный А.А. и др. Эпидемиология эндопротезирования тазобедренного и коленного суставов и перипротезной инфекции в Российской Федерации. *Травматология и ортопедия России* 2021;27(3):84–93. DOI: 10.21823/2311-2905-2021-27-3-84-93  
Serda A.P., Kochish A.A., Cherny A.A. et al. Epidemiology of hip and knee arthroplasty and periprosthetic joint infection in Russian federation. *Travmatologiya y ortopediya v Rossii = Traumatology and Orthopedics in Russia* 2021;27(3):84–93. (In Russ.). DOI: 10.21823/2311-2905-2021-27-3-84-93
- De Cecco M., Ito T., Petrashen A.P. et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* 2019;566(7742):73–8. DOI: 10.1038/s41586-018-0784-9
- Gorbunova V., Seluanov A., Mita P. et al. The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature* 2021;596(7870):43–53. DOI: 10.1038/s41586-021-03542-y
- Van Meter M., Kashyap M., Rezazadeh S. et al. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat Commun* 2014;5:5011. DOI: 10.1038/ncomms6011
- Zhou F., Mei J., Han X. et al. Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF- $\kappa$ B/MAPK signaling and protecting chondrocytes. *Acta Pharm Sin B* 2019;9(5):973–85. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.01.015
- Knights A.J., Redding S.J., Maerz T. Inflammation in osteoarthritis: the latest progress and ongoing challenges. *Curr Opin Rheumatol* 2023;35(2):128–34. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000923
- Simon T.C., Jeffries M.A. The epigenomic landscape in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2017;19(6):30. DOI: 10.1007/s11926-017-0661-9
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 2017;21(6):742–9.
- Wei G., Qin S., Li W. et al. MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2016;13(6):1155–60. DOI: 10.1109/TCBB.2015.2511767
- Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA* 2014;20(7):959–76. DOI: 10.1261/rna.044560.114
- Uhalte E.C., Wilkinson J.M., Southam L., Zeggini E. Pathways to understanding the genomic aetiology of osteoarthritis. *Hum Mol Genet* 2017;26:R193–201. DOI: 10.1093/hmg/ddx302
- Zhang J., Zhang S., Zhou Y. et al. KLF9 and EPYC acting as feature genes for osteoarthritis and their association with immune infiltration. *J Orthop Surg Res* 2022;17(1):365. DOI: 10.1186/s13018-022-03247-6
- Xu W.D., Huang Q., Huang A.F. Emerging role of galectin family in inflammatory autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2021;20(7):102847. DOI: 10.1016/j.autrev.2021.102847
- Colasanti T., Sabatinelli D., Mancone C. et al. Homocysteinylated alpha 1 antitrypsin as an antigenic target of autoantibodies in seronegative rheumatoid arthritis patients. *J Autoimmun* 2020;113:102470. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102470
- Kenny J., Mullin B.H., Tomlinson W. et al. Age-dependent genetic regulation of osteoarthritis: independent effects of immune system genes. *Arthritis Res Ther* 2023;25(1):232. DOI: 10.1186/s13075-023-03216-2
- Goldmann K., Spiliopoulou A., Iakovliev A. et al. Expression quantitative trait loci analysis in rheumatoid arthritis identifies tissue specific variants associated with severity and outcome. *Ann Rheum Dis* 2024;83(3):288–99. DOI: 10.1136/ard-2023-224540
- Szulc M., Swatkowska-Stodulska R., Pawlowska E., Derwich M. Vitamin D<sub>3</sub> metabolism and its role in temporomandibular joint osteoarthritis and autoimmune thyroid diseases. *Int J Mol Sci* 2023;24(4):4080. DOI: 10.3390/ijms24044080
- Jian J., Li G., Hettinghouse A., Liu C. Progranulin: A key player in autoimmune diseases. *Cytokine* 2018;101:48–55. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.08.007
- Akhter S., Tasnim F.M., Islam M.N. et al. Role of Th17 and IL-17 cytokines on inflammatory and auto-immune diseases. *Curr Pharm Des* 2023;29(26):2078–90. DOI: 10.2174/1381612829666230904150808
- Saetan N., Honsawek S., Tanavalee S. et al. Association of plasma and synovial fluid interferon- $\gamma$  inducible protein-10 with radiographic severity in knee osteoarthritis. *Clin Biochem* 2011;44(14-15):1218–22. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.07.010
- Li S., Ren Y., Peng D. et al. TIM-3 genetic variations affect susceptibility to osteoarthritis by interfering with interferon gamma in CD4<sup>+</sup> T cells. *Inflammation* 2015;38(5):1857–63. DOI: 10.1007/s10753-015-0164-7
- Guo Q., Chen X., Chen J. et al. STING promotes senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Death Dis* 2021;12(1):13. DOI: 10.1038/s41419-020-03341-9
- de Groen R.A., Liu B.S., Boonstra A. Understanding IFN $\lambda$  in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014;16(1):102. DOI: 10.1186/ar4445
- Lee Y.H., Song G.G. Association between the interferon- $\gamma$  + 874 T/A polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Int J Immunogenet* 2022;49(6):365–71. DOI: 10.1111/iji.12599
- Toro-Domínguez D., Carmona-Sáez P., Alarcón-Riquelme M.E. Shared signatures between rheumatoid arthritis, systemic lupus

- erythematosus and Sjögren's syndrome uncovered through gene expression meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2014;16(6):489. DOI: 10.1186/s13075-014-0489-x
29. Xu J., Chen K., Yu Y. et al. Identification of immune-related risk genes in osteoarthritis based on bioinformatics analysis and machine learning. *J Pers Med* 2023;13(2):367. DOI: 10.3390/jpm13020367
  30. Li J., Wang G., Xu X. et al. Identification of immune-associated genes in diagnosing osteoarthritis with metabolic syndrome by integrated bioinformatics analysis and machine learning. *Front Immunol* 2023;14:1134412. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1134412
  31. Gomes da Silva I.I.F., Barbosa A.D., Souto F.O. et al. MYD88, IRAK3 and rheumatoid arthritis pathogenesis: analysis of differential gene expression in CD14<sup>+</sup> monocytes and the inflammatory cytokine levels. *Immunobiology* 2021;226(6):152152. DOI: 10.1016/j.imbio.2021.152152
  32. Zhang Q., Sun C., Liu X. et al. Mechanism of immune infiltration in synovial tissue of osteoarthritis: a gene expression-based study. *J Orthop Surg Res* 2023;18(1):58. DOI: 10.1186/s13018-023-03541-x
  33. Pan L., Yang F., Cao X. et al. Identification of five hub immune genes and characterization of two immune subtypes of osteoarthritis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14:1144258. DOI: 10.3389/fendo.2023.1144258
  34. Cheng P., Gong S., Guo C. et al. Exploration of effective biomarkers and infiltrating Immune cells in osteoarthritis based on bioinformatics analysis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2023;51(1):242–54. DOI: 10.1080/21691401.2023.2185627
  35. Xia D., Wang J., Yang S. et al. Identification of key genes and their correlation with immune infiltration in osteoarthritis using integrative bioinformatics approaches and machine-learning strategies. *Medicine (Baltimore)* 2023;102(46):e35355. DOI: 10.1097/MD.00000000000035355
  36. Qin J., Zhang J., Wu J.J. et al. Identification of autophagy-related genes in osteoarthritis articular cartilage and their roles in immune infiltration. *Front Immunol* 2023;14:1263988. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1263988
  37. Wang L., Ye S., Qin J. et al. Ferroptosis-related genes LPCAT3 and PGD are potential diagnostic biomarkers for osteoarthritis. *J Orthop Surg Res* 2023;18(1):699. DOI: 10.1186/s13018-023-04128-2
  38. Xu L., Wang Z., Wang G. Screening of biomarkers associated with osteoarthritis aging genes and immune correlation studies. *Int J Gen Med* 2024;17:205–24. DOI: 10.2147/IJGM.S447035
  39. Yang L., Chen Z., Guo H. et al. Extensive cytokine analysis in synovial fluid of osteoarthritis patients. *Cytokine* 2021;143:155546. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155546
  40. Liu Y., Lu T., Liu Z. et al. Six macrophage-associated genes in synovium constitute a novel diagnostic signature for osteoarthritis. *Front Immunol* 2022;13:936606. DOI: 10.3389/fimmu.2022.936606
  41. Zhang B., Gu J., Wang Y. et al. TNF- $\alpha$  stimulated exosome derived from fibroblast-like synoviocytes isolated from rheumatoid arthritis patients promotes HUVEC migration, invasion and angiogenesis by targeting the miR-200a-3p/KLF6/VEGFA axis. *Autoimmunity* 2023;56(1):2282939. DOI: 10.1080/08916934.2023.2282939
  42. Ye Y., Bao C., Fan W. Overexpression of miR-101 may target DUSP1 to promote the cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *J Comput Biol* 2019;26(10):1067–79. DOI: 10.1089/cmb.2019.0021
  43. Chen M., Li M., Zhang N. et al. Mechanism of miR-218-5p in autophagy, apoptosis and oxidative stress in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts is mediated by KLF9 and JAK/STAT3 pathways. *J Invest Med* 2021;69(4):824–32. DOI: 10.1136/jim-2020-001437
  44. Cortes-Altamirano J.L., Morraz-Varela A., Reyes-Long S. et al. Chemical mediators' expression associated with the modulation of pain in rheumatoid arthritis. *Curr Med Chem* 2020;27(36):6208–18. DOI: 10.2174/0929867326666190816225348
  45. Morel J., Roch-Bras F., Molinari N. et al. HLA-DMA\*0103 and HLA-DMB\*0104 alleles as novel prognostic factors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63(12):1581–6. DOI: 10.1136/ard.2003.012294
  46. Rong H., He X., Wang L. et al. Association between *IL1B* polymorphisms and the risk of rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol* 2020;83:106401. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106401
  47. Liu X., Peng L., Li D. et al. The impacts of *IL1R1* and *IL1R2* genetic variants on rheumatoid arthritis risk in the Chinese Han population: a case-control study. *Int J Gen Med* 2021;14:2147–59. DOI: 10.2147/IJGM.S291395
  48. Hernández-Bello J., Oregón-Romero E., Vázquez-Villamar M. et al. Aberrant expression of interleukin-10 in rheumatoid arthritis: relationship with IL-10 haplotypes and autoantibodies. *Cytokine* 2017;95:88–96. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.02.022
  49. Mandik-Nayak L., DuHadaway J.B., Mulgrew J. et al. RhoB blockade selectively inhibits autoantibody production in autoimmune models of rheumatoid arthritis and lupus. *Dis Model Mech* 2017;10(11):1313–22. DOI: 10.1242/dmm.029835
  50. Fida S., Myers M.A., Whittingham S. et al. Autoantibodies to the transcriptional factor SOX13 in primary biliary cirrhosis compared with other diseases. *J Autoimmun* 2002;19(4):251–7. DOI: 10.1006/jaut.2002.0622
  51. Lee Y.H., Song G.G. Associations between TNFAIP3 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis update with trial sequential analysis. *Public Health Genomics* 2022;12:1–11. DOI: 10.1159/000526212
  52. Okada Y., Wu D., Trynka G. et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014;506(7488):376–81. DOI: 10.1038/nature12873
  53. Mousavi M.J., Shayesteh M.R.H., Jamalzei S. et al. Association of the genetic polymorphisms in inhibiting and activating molecules of immune system with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *J Res Med Sci* 2021;26:22. DOI: 10.4103/jrms.JRMS\_567\_20
  54. Budhiparama N.C., Lumban-Gaol I., Sudoyo H. et al. Interleukin-1 genetic polymorphisms in knee osteoarthritis: What do we know? A meta-analysis and systematic review. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2022;30(1):23094990221076652. DOI: 10.1177/23094990221076652
  55. Deng X., Ye K., Tang J. et al. Association of *rs1800795* and *rs1800796* polymorphisms in interleukin-6 gene and osteoarthritis risk: evidence from a meta-analysis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2023;42:328–42. DOI: 10.1080/15257770.2022.2147541
  56. Lu F., Liu P., Zhang Q. et al. Association between the polymorphism of *IL-17A* and *IL-17F* gene with knee osteoarthritis risk: a meta-analysis based on case-control studies. *J Orthop Surg Res* 2019;14(1):445. DOI: 10.1186/s13018-019-1495-0
  57. Rogoveanu O.C., Calina D., Cucu M.G. et al. Association of cytokine gene polymorphisms with osteoarthritis susceptibility. *Exp Ther Med* 2018;16(3):2659–64. DOI: 10.3892/etm.2018.6477
  58. Moos V., Menard J., Sieper J. et al. Association of HLA-DRB1\*02 with osteoarthritis in a cohort of 106 patients. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(6):666–9. DOI: 10.1093/rheumatology/41.6.666
  59. Jurynek M.J., Sawitzke A.D., Beals T.C. et al. A hyperactivating proinflammatory RIPK2 allele associated with early-onset osteoarthritis. *Hum Mol Genet* 2018;27(13):2383–91. DOI: 10.1093/hmg/ddy132
  60. Yang H.Y., Lee H.S., Lee C.H. et al. Association of a functional polymorphism in the promoter region of TLR-3 with osteoarthritis: A two-stage case-control study. *J Orthop Res* 2013;31:680–5. DOI: 10.1002/jor.22291

61. Stefik D., Vranic V., Ivkovic N. et al. Potential impact of polymorphisms in Toll-like receptors 2, 3, 4, 7, 9, *miR-146a*, *miR-155*, and *miR-196a* genes on osteoarthritis susceptibility. *Biology* 2023;12:458. DOI: 10.3390/biology12030458
62. Yi X., Xu E., Xiao Y., Cai X. Evaluation of the relationship between common variants in the *TLR-9* gene and hip osteoarthritis susceptibility. *Genet Test Mol Biomark* 2019;23(6):373–9. DOI: 10.1089/gtmb.2019.0010
63. Tang H., Cheng Z., Ma W. et al. TLR10 and NFKBIA contributed to the risk of hip osteoarthritis: systematic evaluation based on Han Chinese population. *Sci Rep* 2018;8:10243. DOI: 10.1038/s41598-018-28597-2
64. Wang X., Ning Y., Zhou B. et al. Integrated bioinformatics analysis of the osteoarthritis-associated microRNA expression signature. *Mol Med Rep* 2018;17(1):1833–8. DOI: 10.3892/mmr.2017.8057
65. Mohebi N., Damavandi E., Rostamian A.R. et al. Comparison of plasma levels of MicroRNA-155-5p, MicroRNA-210-3p, and MicroRNA-16-5p in rheumatoid arthritis patients with healthy controls in a case-control study. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2023;22(4):354–65. DOI: 10.18502/ijaa.v22i4.13608
66. Yang L., Yang S., Ren C. et al. Deciphering the roles of miR-16-5p in malignant solid tumors. *Biomed Pharmacother* 2022;148:112703. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112703
67. Liu X., Ni S., Li C. et al. Circulating microRNA-23b as a new biomarker for rheumatoid arthritis. *Gene* 2019;712:143911. DOI: 10.1016/j.gene.2019.06.001
68. Cheng Q., Chen X., Wu H., Du Y. Three hematologic/immune system-specific expressed genes are considered as the potential biomarkers for the diagnosis of early rheumatoid arthritis through bioinformatics analysis. *J Transl Med* 2021;19(1):18. DOI: 10.1186/s12967-020-02689-y
69. Zeng Z., Li Y., Pan Y. et al. Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nat Commun* 2018;9(1):5395. DOI: 10.1038/s41467-018-07810-w
70. Law Y.Y., Lee W.F., Hsu C.J. et al. miR-let-7c-5p and miR-149-5p inhibit proinflammatory cytokine production in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Aging (Albany NY)* 2021;13(13):17227–36. DOI: 10.18632/aging.203201
71. Liu H., Yan L., Li X. et al. MicroRNA expression in osteoarthritis: a meta-analysis. *Clin Exp Med* 2023;23(7):3737–49. DOI: 10.1007/s10238-023-01063-8
72. Bae S.C., Lee Y.H. miR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 2018;21(7):1335–42. DOI: 10.1111/1756-185X.13338
73. Zheng J., Wang Y., Hu J. Study of the shared gene signatures of polyarticular juvenile idiopathic arthritis and autoimmune uveitis. *Front Immunol* 2023;14:1048598. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1048598
74. Tavassolian F., Hosseini A.Z., Soudi S., Naderi M. miRNA-146a improves immunomodulatory effects of MSC-derived exosomes in rheumatoid arthritis. *Curr Gene Ther* 2020;20(4):297–312. DOI: 10.2174/1566523220666200916120708
75. Li Z., Zhao W., Wang M. et al. Role of microRNAs deregulation in initiation of rheumatoid arthritis: a retrospective observational study. *Medicine (Baltimore)* 2024;103(3):e36595. DOI: 10.1097/MD.00000000000036595
76. Semerci Sevimli T., Sevimli M., Qomi Ekenel E. et al. Comparison of exosomes secreted by synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in culture for microRNA-127-5p expression during chondrogenesis. *Gene* 2023;865:147337. DOI: 10.1016/j.gene.2023.147337
77. Yin M., Zhang Z., Wang Y. Anti-tumor effects of miR-34a by regulating immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Medicine* 2023;12(10):11602–10. DOI: 10.1002/cam4.5826
78. Zhu J., Yang S., Qi Y. et al. Stem cell-homing hydrogel-based miR-29b-5p delivery promotes cartilage regeneration by suppressing senescence in an osteoarthritis rat model. *Sci Adv* 2022;8(13):eabk0011. DOI: 10.1126/sciadv.abk0011
79. Zhang Y., Li S., Jin P. et al. Dual functions of microRNA-17 in maintaining cartilage homeostasis and protection against osteoarthritis. *Nat Commun* 2022;13(1):2447. DOI: 10.1038/s41467-022-30119-8
80. Farghadan M., Zavarani-Hosseini A., Farhadi E. et al. MicroRNA-211-5p overexpression effect on endoplasmic reticulum stress and apoptotic genes in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2022;21(4):418–28. DOI: 10.18502/ijaa.v21i4.10289

**ORCID автора / ORCID of author**

Р.Н. Мустафин / R.N. Mustafin: <https://orcid.org/0000-0002-4091-382X>

**Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.**

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

**Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.**

**Funding.** The study was performed without external funding.

Статья поступила: 01.04.2024. Принята в печать: 06.03.2025. Опубликовано онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 01.04.2024. Accepted for publication: 06.03.2025. Published online: 27.06.2025.

# Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток – натуральных киллеров

П.О. Фёдорова<sup>1–3</sup>, И.О. Чикилева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Полина Олеговна Фёдорова [ppolite@mail.ru](mailto:ppolite@mail.ru)

**Введение.** Одним из подходов для обогащения популяций натуральных киллеров (НК) и натуральных киллеров Т-клеток (НКТ-клеток) для последующей CAR-терапии (CAR – химерный рецептор антигена) является культивирование в присутствии определенных цитокинов и/или фидерных клеток.

**Цель исследования** – оценка воздействия на НК- и НКТ-клетки комбинаций интерлейкинов (ИЛ): ИЛ-2 + ИЛ-15, ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 или только ИЛ-2 при длительном культивировании в присутствии аутологичных фидерных клеток, в качестве которых выступали необлученные Т-лимфоциты, активированные моноклональными анти-телами (МАТ).

**Материалы и методы.** В качестве источника мононуклеарных клеток человека использовали периферическую кровь и лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат. После выделения мононуклеарных клеток проводили активацию полученной культуры лимфоцитов с помощью сорбированных МАТ к CD3- и CD28-рецепторам. Затем осуществляли культивирование активированных лимфоцитов в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15, ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 или только ИЛ-2, периодически оценивая прирост общего количества клеток, экспрессию поверхностных маркеров и цитотоксическую активность.

**Результаты.** При использовании комбинации ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 наблюдали наибольший прирост клеток и максимальную цитотоксичность, доля НКТ-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) к концу срока культивирования также была наибольшей относительно других режимов культивирования и составила 59 %. В присутствии комбинации ИЛ-2 и ИЛ-15 определяли более низкую цитотоксичность культивируемых лимфоцитов по сравнению с другими вариантами эксперимента, что может быть связано с истощением клеточной популяции. Согласно данным литературы, добавление в культуральную среду ИЛ-21, вероятно, нивелирует данное отрицательное воздействие ИЛ-15.

**Заключение.** С учетом динамики пролиферации, рецепторного профиля и цитотоксичности культивируемых лимфоцитов можно заключить, что комбинация цитокинов, состоящая из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, является наиболее эффективной для обогащения популяции НКТ-клеток при стимуляции МАТ и в присутствии аутологичных активированных Т-лимфоцитов. Для максимально эффективного получения популяции НК-клеток требуется использование других фидерных клеток, вероятно, опухолевого происхождения, либо иных протоколов экспансии.

**Ключевые слова:** CAR-НК-клетки, CAR-НКТ-клетки, CAR-терапия, интерлейкин 21, интерлейкин 15

**Для цитирования:** Фёдорова П.О., Чикилева И.О. Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток – натуральных киллеров. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):22–31.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-22-31>

## Evaluation of the effects of different interleukin combinations on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells

Polina O. Fedorova<sup>1-3</sup>, Irina O. Chikileva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Lane, Moscow 105064, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia

**Contacts:** Polina Olegovna Fedorova [ppolite@mail.ru](mailto:ppolite@mail.ru)

**Background.** One of the approaches to expand natural killer (NK) and NKT cells for subsequent CAR (chimeric antigen receptor) therapy is cultivation in the presence of certain cytokines and/or feeder cells.

**Aim.** To evaluate the effect of combinations of interleukin (IL): IL-2 + IL-15, IL-2 + IL-15 + IL-21 or IL-2 alone on NK and NKT cells during long-term cultivation in the presence of autologous feeder cells, which were non-irradiated T lymphocytes activated by monoclonal antibodies (mAbs).

**Materials and methods.** Peripheral blood and leukocyte-platelet concentrate were used as a source of peripheral blood mononuclear cell. After peripheral blood mononuclear cell isolation, the lymphocyte culture was activated using adsorbed mAbs to CD3 and CD28 receptors. Then, activated lymphocytes were cultured in the presence of IL-2 + IL-15, IL-2 + IL-15 + IL-21, or IL-2 alone, periodically assessing the increase in the total number of cells, expression of surface markers, and cytotoxic activity.

**Results.** Using the combination of IL-2 + IL-15 + IL-21, the greatest increase in cells and maximum cytotoxicity were observed; the proportion of NKT cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) by the end of the cultivation was also the highest compared to other cultivation modes and amounted to 59 %. In the presence of a combination of IL-2 and IL-15, lower cytotoxicity of the cultured lymphocytes was determined compared to other experimental options, which may be due to exhaustion of the cell population. Based on the literature data, the addition of IL-21 to the culture medium probably neutralizes this negative effect of IL-15.

**Conclusion.** Based on the dynamics of proliferation, receptor expression and cytotoxicity of cultured lymphocytes, it can be concluded that the cytokine combination consisting of IL-2, IL-15 and IL-21 is most effective for enriching the NKT cell population upon stimulation with mAb and in the presence of autologous activated T lymphocytes. For the most effective generation of the NK cell population, it is necessary to use other feeder cells, probably of tumor origin, or other expansion protocols.

**Keywords:** CAR NK cells, CAR NKT cells, CAR therapy, interleukin-21, interleukin-15

**For citation:** Fedorova P.O., Chikileva I.O. Evaluation of the effects of different interleukin combinations on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells. Rossijskij bioterapevticeskij žurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):22–31. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-22-31>

### Введение

Адоптивная иммунотерапия, применяемая для лечения онкологических заболеваний, вызвала значительный прогресс в эффективности лечения рака, особенно В-клеточных лимфом, при иммунотерапии которых ремиссия наступает у 25–50 % пациентов. Так, терапия на основе химерного рецептора антигена (CAR) направлена на повышение способности иммунных клеток распознавать опухолеассоциированные антигены и уничтожать опухолевые клетки [1]. CAR-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности химерный рецептор к опухолеассоциированным антигенам, причем генетическая последовательность, кодирующая данный рецептор, вводится лимфоцитам посредством различных методов генетической модификации в условиях *in vitro* [2].

В настоящее время клеточная терапия на основе CAR-T-лимфоцитов с успехом применяется для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, остро-

го лимфобластного В-клеточного лейкоза и диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы [3]. Терапия на основе Т-лимфоцитов, экспрессирующих CAR, показала высокие клинические результаты при гематологических злокачественных новообразованиях, применение CAR-T-лимфоцитов для лечения солидных опухолей различного генеза находится на стадии клинических испытаний [4]. Тем не менее данный подход к иммунотерапии рака имеет ряд недостатков и ограничений. Проявление токсической реакции в тканях, не пораженных опухолью (главным образом нейротоксичность), и развитие синдрома высвобождения цитокинов представляют собой основные побочные явления, ограничивающие терапевтический индекс и, как следствие, его терапевтическое применение [5]. К нежелательным реакциям также относится миграция CAR-T-клеток за пределы опухоли, синдром распада злокачественной опухоли и цитопения [6]. Другим недостатком применения

CAR-T-терапии является необходимость тщательной оценки степени совместимости донора и реципиента по системе главных лейкоцитарных антигенов человека (HLA-антигенам). Выбор аутологичного источника Т-клеток бывает затруднительным ввиду иммуносупрессивного воздействия химио-, лучевой терапии или подавления иммунитета опухолью. Вследствие этого процесс создания индивидуально-го биомедицинского клеточного продукта (и-БМКП) на основе CAR-T-лимфоцитов длительный и трудоемкий ввиду подбора подходящего донора клеток (персонализированный), что влияет на стоимость лечения и сроки начала введения пациенту и-БМКП.

В качестве способа преодоления существующих проблем CAR-T-терапии предлагается использование в качестве клеток-эффекторов других клеток иммунной системы, обладающих цитотоксическими свойствами, — натуральных киллеров (НК) и натуральных киллеров Т-клеток (НКТ-клеток). CAR-терапия на основе НК-клеток не требует подбора донора по системе HLA [7], поэтому БМКП в данном случае могут изготавливаться заранее, в больших количествах, а затем проходить этап криоконсервации. Таким образом, пациент может незамедлительно начать проходить курс иммунотерапии, кроме того, стоимость клеточного продукта за счет массового производства препарата будет снижена. Существенными достоинствами НК-клеток при их использовании в иммунотерапии являются распознавание нормальных клеток с помощью группы KIR-рецепторов (killer-cell immunoglobulin-like receptors) клеток и осуществление эффекторной функции 2 различными механизмами: путем секреторного и несекреторного лизиса [8]. Кроме того, при введении пациентам популяции НК не наблюдается выраженных побочных эффектов [9]. Тем не менее относительно Т-лимфоцитов НК-клетки хуже поддаются генетической модификации, имеют короткий жизненный цикл и ограниченную экспансию зрелой популяции [10]. Следовательно, *in vitro* экспансия НК-клеток и поддержание их цитотоксической функции являются важным этапом при разработке CAR-НК-клеток.

Использованию НКТ-клеток для CAR-терапии способствуют следующие свойства данной популяции: мощная противоопухолевая активность посредством прямой цитотоксичности или активации  $\alpha\beta$ T-клеток, снижение ингибирующей активности опухолеассоциированных макрофагов и миелоидных супрессорных клеток, а также отсутствие риска развития реакции «трансплантат против хозяина» ввиду активации через ингибирующие рецепторы НК [11]. Несмотря на многообещающие результаты исследований CAR-НКТ-клеток в доклинических и клинических исследованиях, существует несколько трудностей при разработке технологии подобного рода. Например, незначительное количество НКТ-клеток

в периферической крови человека требует использования методик для экспансии НКТ-клеток *in vitro*.

Согласно данным литературы, существует 3 подхода к обогащению популяций НК- и НКТ-клеток: использование специфических веществ — активаторов пролиферации, культивирование в присутствии определенных цитокинов или соинкубация с фидерными клетками [12]. Исторически первым цитокином, который начали применять для повышения цитотоксичности НК-клеток как *in vivo*, так и *ex vivo*, был интерлейкин (ИЛ) 2. При использовании ИЛ-2 в низких дозах наблюдаются экспансия НК-клеток и увеличение их противоопухолевой активности [13]. ИЛ-2 вызывает повышенную секрецию цитокинов НК, усиливает внутриклеточную передачу сигналов STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)/АКТ (protein kinase B) и активирует группу различных рецепторов естественной токсичности и NKG2D-рецептор (natural killer group 2, member D) [13]. ИЛ-2-активированные НК-клетки проявляют гораздо более высокую цитотоксическую активность в отношении культуры-мишени K562 и более высокую жизнеспособность после криоконсервации по сравнению с нестимулированными НК-клетками [14]. Другим цитокином, который играет важную роль в активации НК-клеток, является ИЛ-15. Он способствует выживаемости НК, увеличивает продолжительность жизни и противоопухолевую активность НКТ-клеток [15]. Для экспансии НК-клеток также используют ИЛ-21, который участвует в дифференцировке НК-клеток из гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток и усиливает цитотоксичность и секрецию цитокинов [16]. Помимо того, для экспансии НК-клеток применяют ИЛ-12 и ИЛ-18, которые повышают эффекторные функции и участвуют в формировании цитокин-индуцированной субпопуляции НК-клеток памяти [17].

В качестве фидерных клеток используют аутологичные или аллогенные источники клеток, которые до соинкубации с НК-клетками проходят процесс иррадиации или обработки митостатиками для блокировки их клеточного деления. В качестве аллогенных фидерных клеток рассматриваются опухолевые линии, являющиеся естественной мишенью для НК-клеток или экспрессирующие трансгенные мембраносвязанные лиганды для распознавания НК-клетками [18]. Аутологичные фидерные клетки — популяции иммунных клеток, выделяемые одновременно из того же источника, что и НК. Так, данные клетки выделяют спектр необходимых цитокинов, а также способствуют активации НК- и НКТ-клеток посредством прямого межклеточного взаимодействия [33].

В данном исследовании проводили культивирование НК- и НКТ-клеток в присутствии необлученных аутологичных фидерных клеток, в качестве которых

выступали Т-клетки, активированные моноклональными антителами (МАТ) к CD3- и CD28-рецепторам.

**Цель исследования** — оценка воздействия на НК- и НКТ-клетки комбинаций: ИЛ-2 + ИЛ-15, ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 или только ИЛ-2 при длительном культивировании в присутствии аутологичных фидерных клеток, в качестве которых выступали необлученные Т-лимфоциты, активированные МАТ.

## Материалы и методы

### Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата проводили с использованием метода седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фикола ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ). Кровь из пробирок, содержащих этилендиаминтетрауксусную кислоту, разводили в 2 раза раствором Хенкса («ПанЭко», Россия). При выделении клеток из лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата его центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g и температуре 23 °C, отбирали лейкоцитарный слой и разводили его средой (раствором Хенкса) в 3 раза. Затем независимо от источника МНК образцы наслаивали на 1,5 мл фикола (Ficoll Paque, GE Healthcare, США) и центрифугировали в течение 25 мин при 1500 g и температуре 23 °C. Отбирали слой МНК и осуществляли 3-кратную отмывку раствором Хенкса, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 g, температуре 23 °C и каждый раз отбирая после этого надосадочную жидкость. Далее проводили подсчет живых клеток с использованием красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия), окрашивающего нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной, в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Показатель жизнеспособности >90 %, определяемый автоматически как отношение живых клеток к общему количеству клеток, выраженное в процентах, считали удовлетворительным. Клетки доводили до рабочей концентрации  $3,5\text{--}4 \times 10^6/\text{мл}$  с помощью питательной среды DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия) и 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия). После этого свежeweделенные МНК подвергали активации.

### Сорбция моноклональных антител для последующей активации мононуклеарных клеток

Для активации МНК использовали МАТ к CD3- и CD28-рецепторам (BioLegend, США) в концентрации 2,5 мкг/мл анти-CD3-антител и 5 мкг/мл анти-CD28-антител. Для достижения заданной концентрации

антител готовили их растворы в стерильном фосфатном буферном солевом растворе (ФСБ) и добавляли по 1 мл/лунку в стерильный 12-луночный культуральный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея). Затем проводили инкубацию в течение 5 ч с последующей трехкратной отмывкой от несвязавшихся антител с помощью 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Roedermark, Germany) в ФСБ.

### Активация свежeweделенных мононуклеарных клеток

При активации МАТ суспензию свежeweделенных МНК вносили к сорбированным антителам в концентрации  $3,5\text{--}4 \times 10^6/\text{мл}$  и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе модели SCO5A (Sheldon Manufacturing Inc, США).

### Культивирование лимфоцитов

Культивирование лимфоцитов проводили в течение 21 дня с момента выделения МНК. Клетки культивировали в 12- и 6-луночных культуральных планшетах (SPL life Sciences, Республика Корея) в присутствии питательной среды DMEM с 4,5 г/л глюкозы, 10 % FBS, 250–500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2 (Xuri, Китай), 10 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-15 (Sci-Store, Россия), 20 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-21 (Peprotech, США) при температуре 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Каждые 1–2 дня с помощью световой микроскопии производили контроль фенотипических характеристик лимфоцитов и визуальный контроль отсутствия микробной контаминации. С использованием трипанового синего и автоматического счетчика клеток проводили оценку жизнеспособности и количества культивируемых клеток на 3, 7, 11, 14, 18 и 21-е сутки культивирования. Показатель жизнеспособности >90 % считали удовлетворительным. Концентрацию клеток при культивировании поддерживали в диапазоне от  $3 \times 10^5/\text{мл}$  до  $1 \times 10^6/\text{мл}$ .

### Определение количества лимфоцитов

Подсчет живых культивируемых клеток проводили с использованием красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия) в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Для дальнейшего расчета допускались только живые клетки. Общее количество клеток определяли по следующей формуле:

$$\begin{aligned} & \text{Общее количество клеток к } n\text{-дню, млн/мл} = \\ & \frac{\text{количество клеток в } m\text{-день при подсчете, млн/мл} \times \\ & \quad \text{количество клеток}}{\times \frac{\text{в } n\text{-день при подсчете, млн/мл}}{\text{количество клеток в } m\text{-день}}}, \quad (1) \\ & \text{при посеве, млн/мл} \end{aligned}$$

где  $n$  — день культивирования, в который проводят определение общего количества клеток;  $m$  — предыдущий день подсчета и посева клеток относительно  $n$ -дня.

### Культивирование культур клеток

В работе использовали опухолевую линию клеток HG3, полученную из коллекции клеточных культур НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. При работе с культурой HG3 использовали питательную среду RPMI 1640, содержащую 4,5 г/л глюкозы, 10 % FBS и пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия). Клеточную линию инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °C.

### Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии производили анализ экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов. На этапе пробоподготовки жизнеспособные клетки подсчитывали и доводили до концентрации  $1 \times 10^6$ /мл. К 100 мкл суспензии клеток заданной концентрации добавляли меченные флуорохромом МАТ в концентрациях, рекомендованных производителем. Инкубировали в течение 30 мин при температуре 4 °C в холодильнике (Hitachi, Япония). Затем проводили 3-кратную отмывку раствором ФСБ от несвязавшихся антител, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 g и температуре 23 °C и удаляя надосадочную жидкость. К осадку прибавляли 200 мкл ФСБ и раствор пропидия йодида (PI) до конечной концентрации 30 нг/мл (Sigma, США). Изучение экспрессии поверхностных маркеров осуществляли при использовании следующих МАТ: анти-CD3-PerCP (BD Pharmingen, США), анти-CD3-FITC (Beckman Coulter, США), анти-CD56-PE (Life Technologies, США), анти-CD (56<sup>+</sup>16) — PE (Beckman Coulter, США), анти-CD8-APC (Invitrogen, США), анти-CD4-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США), анти-NKp30/CD337-PE (BD Pharmingen, США), анти-NKG2D/CD314-APC (BD Pharmingen, США). Комбинацию меченных флуорохромами антител для обработки проб подбирали с учетом особенности диапазона детекции длины волны каждого флуорохрома. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences Inc, США) с использованием специализированного программного обеспечения NovoExpress 1.5.0. Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию PI и по показателям рассеивания. Анализировали не менее 10 тыс. живых клеток.

### Цитотоксический тест

Для оценки эффекторной функции культивируемых лимфоцитов использовали раствор резазурина в концентрации 5 мг/мл (Sigma-Aldrich, США).

В качестве культуры-мишени использовали клеточную линию HG3. Для проведения цитотоксического теста использовали стерильные 96-луночные планшеты (SPL life Sciences, Республика Корея), в которые одновременно вносили клетки-эффекторы (Э) и клетки-мишени (М) в различных соотношениях Э:М: 10:1, 5:1, 2,5:1, 1:1. При проведении цитотоксического теста концентрация клеток-мишеней составляла  $0,5 \times 10^4$  кл/лунку. В качестве отрицательного контроля использовали лунки, в которые вместо Э вносили полную ростовую среду DMEM. В качестве отрицательного контроля Э использовали лунки, в которые вместо мишеней вносили полную ростовую среду DMEM. Конечный объем в каждой контрольной или экспериментальной лунке составлял 220 мкл. Каждую точку анализировали в 3 повторах. Затем планшет инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °C в течение 1 сут. На следующий день в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора резазурина в соответствии с протоколом AlamarBlue Cell Viability Reagent Product Information Sheet (Pub. No. MAN0018317 C. 0). Затем планшет инкубировали в течение суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °C и измеряли интенсивность флуоресценции на мультирежимном планшетном ридере Spark (Tecan, Швейцария). Анализ проводили при длине возбуждения 560 нм и длине эмиссии 600 нм с использованием программного обеспечения Sparkcontrol v3.1. Цитотоксичность (%) рассчитывали по следующей формуле:

$$(1 - ((\text{Э} + \text{М}) - \text{Э})/\text{М}) \times 100, \quad (2)$$

где  $\text{Э} + \text{М}$  — среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились Э и М; Э — среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились только Э; М — среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились только М.

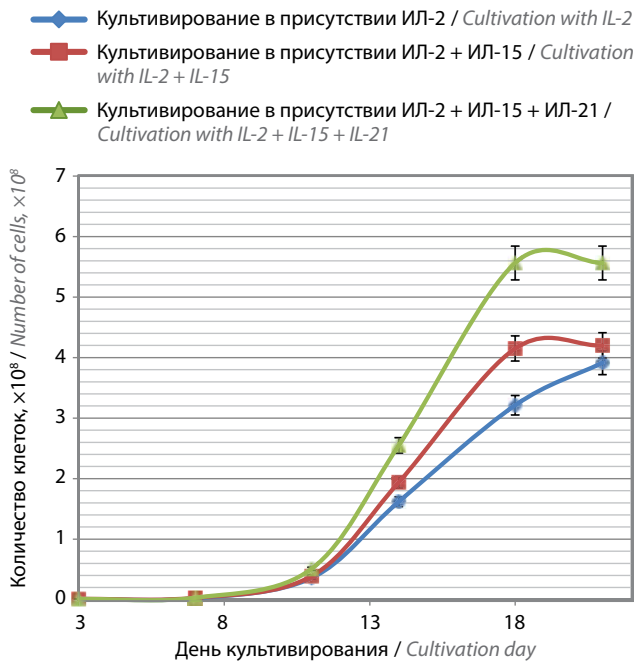
### Статистическая обработка данных

Данные экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  SD. Результаты проанализированы с использованием программы Statistica 10. Тест ANOVA (analysis of variance) с критерием Tukey HSD использовался для оценки различий. Статистически значимыми считали значения  $p < 0,05$ .

### Результаты

#### Определение количества культивируемых лимфоцитов

Результаты определения количества лимфоцитов, культивируемых в присутствии ИЛ-2, ИЛ-2 + ИЛ-15 или ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, представлены на рис. 1.



**Рис. 1.** Динамика пролиферативной активности лимфоцитов в разные дни культивирования;  $p < 0,05$

**Fig. 1.** Dynamics of lymphocyte proliferation on different cultivation days;  $p < 0.05$

Исходя из полученных данных, в интервале с 11-го по 21-й день подсчета наибольший прирост лимфоцитов наблюдается при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21.

#### Оценка популяционного состава культивируемых лимфоцитов и экспрессии поверхностных маркеров

Количество клеток (%), экспрессирующих различные поверхностные маркеры, представлено в табл. 1 и на рис. 2. Так, установлено, что независимо от влияния изучаемых интерлейкинов, присутствующих в питательной среде, на 7-й день культивирования наблюдается увеличение доли Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD56^-$ ) до 95–96 %, которая затем к концу культивирования постепенно снижается до 40–57 % в зависимости от режима культивирования. Снижается также и доля  $CD3^+CD4^+$ -клеток, составляющая 45–54 % всех лимфоцитов на 7-й день и 21–24 % на 21-й день. Количество  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов, наоборот, увеличивается к концу срока культивирования (67–70 %) относительно первоначального значения для данной популяции (25 %). Особо важно подчеркнуть, что при длительном культивировании в течение 21 дня доля  $CD56^+$ -лимфоцитов, составляющая 14,5 % в начале культивирования и 42–60 % на 21-й день исследования, возрастает главным образом за счет популяции НКТ-клеток ( $CD3^+CD56^+$ ), доля которых к концу срока культивирования составляет 42–59 %. Происходит также плавное увеличение

доли клеток, экспрессирующих активационный поверхностный маркер NKG2D, до 34–50 % культивируемых лимфоцитов к концу срока культивирования.

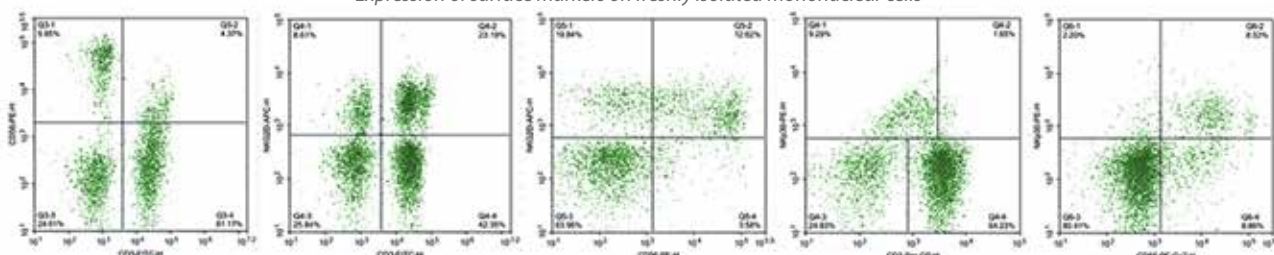
Как видно из данных, представленных в табл. 1, при культивировании лимфоцитов в присутствии комбинации ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 к 21-му дню наблюдения происходит наибольшее увеличение в процентах доли  $CD56^+$ -клеток: 59,68 % в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 против 42,46 и 44,57 % в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-2 + ИЛ-15 соответственно. Также на 21-й день проведения эксперимента в этой группе существенно возрастает доля  $CD56^+NKG2D^+$ -клеток до максимального 50 %-значения среди анализируемых экспериментальных групп и наблюдается незначительное увеличение относительно других режимов культивирования доли НК-клеток ( $CD56^+CD3^-$ ) – 1,12 %. Примечательно, что при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 наблюдается пониженный уровень экспрессии маркера Nkr30<sup>+</sup> на  $CD3^+$ - и  $CD56^+$ -лимфоцитах относительно других режимов культивирования на протяжении всех дней ведения первичной культуры. Доля лимфоцитов, экспрессирующих Nkr30-рецептор, составляет 2,31 % при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, 6,54 % – при использовании только ИЛ-2 и 6,12 % – при добавлении в питательную среду ИЛ-2 + ИЛ-15. Экспрессия Nkr30-маркера прямо коррелирует с количеством НК-клеток в культуре лимфоцитов: при снижении доли натуральных киллеров происходит уменьшение доли Nkr30<sup>+</sup>-клеток. На поздних сроках культивирования все лимфоциты, экспрессирующие данный маркер, являются  $CD3^+$ -популяцией. Экспрессия CD16-рецептора при длительном культивировании снижается от 7,19 % на момент выделения МНК до нулевых значений вне зависимости от используемых интерлейкинов.

#### Изучение эффекторных функций культивируемых лимфоцитов

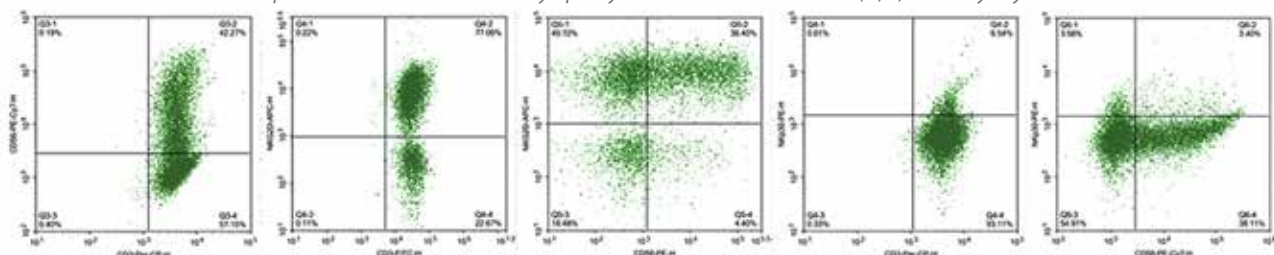
Самые статистически достоверные данные о цитотоксичности культивируемых лимфоцитов в отношении опухолевой линии HG3 выявлены при соотношении Э:М 5:1. Поэтому анализ эффекторных функций проводили только при данном соотношении (табл. 2). В целом при длительном культивировании наблюдается динамика увеличения цитотоксической активности популяции лимфоцитов относительно начала ведения первичной культуры.

Исходя из данных цитотоксического теста, самый высокий процент лизиса опухолевых клеток наблюдается в группе лимфоцитов, при культивировании которых в питательную среду добавляли ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, цитотоксичность в данном случае составляет от 59,3 до 78,9 % в зависимости от дня проведения

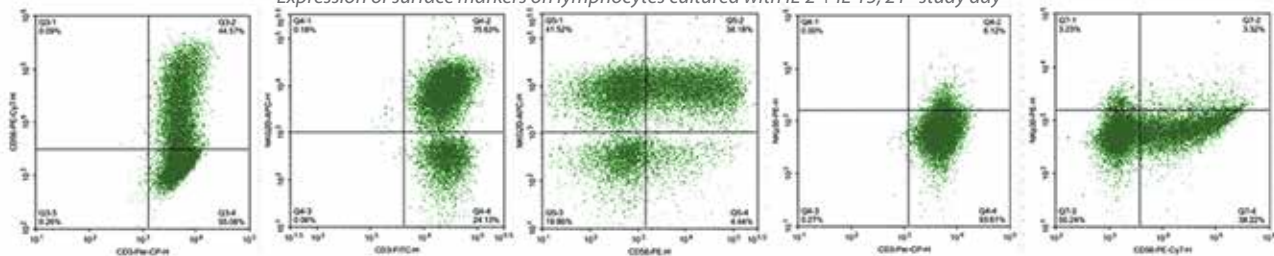
Экспрессия поверхностных маркеров на свежеевыделенных мононуклеарных клетках /  
Expression of surface markers on freshly isolated mononuclear cells



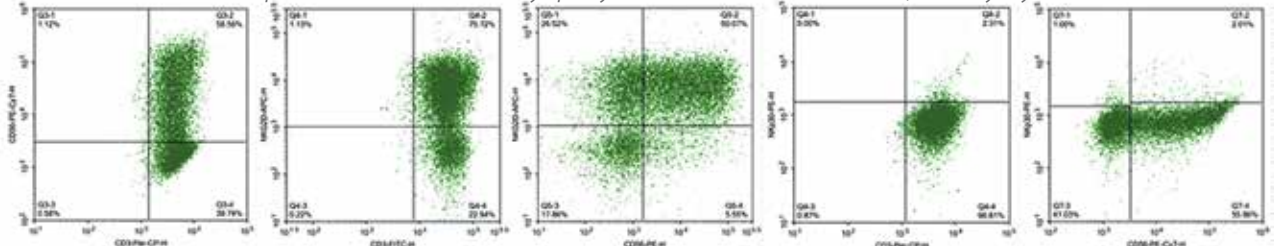
Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии интерлейкина (ИЛ) 2, 21-й день наблюдения /  
Expression of surface markers on lymphocytes cultured with interleukin (IL) 2, 21<sup>st</sup> study day



Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15, 21-й день наблюдения /  
Expression of surface markers on lymphocytes cultured with IL-2 + IL-15, 21<sup>st</sup> study day



Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, 21-й день наблюдения /  
Expression of surface markers on lymphocytes cultured with IL-2 + IL-15 + IL-21, 21<sup>st</sup> study day



**Рис. 2.** Экспрессия поверхностных маркеров на культивируемых лимфоцитах. Результаты представлены по единичному донору и отражают средние значения для проведенной серии экспериментов;  $p < 0,05$

**Fig. 2.** Expression of surface markers on cultured lymphocytes. Results are presented for a single donor and reflect average values for the series of experiments performed;  $p < 0.05$

цитотоксического теста. При использовании комбинации ИЛ-2 + ИЛ-15 начиная с 14-х суток культивирования наблюдается более низкая цитотоксичность лимфоцитов (55,3–60,1 %) относительно других режимов культивирования.

### Обсуждение

Выбранный режим активации пролиферации иммунных клеток интенсивно стимулирует деление Т-клеточного звена. Активированные Т-лимфоциты также вносят свой вклад в общую цитотоксичность первичной культуры лимфоцитов. Однако в данной

работе Т-клетки использовали не в качестве целевой популяции, а как источник провоспалительных цитокинов для роста НК- и НКТ-клеток.

Поскольку при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 к 21-му дню культивирования наблюдается наибольший прирост  $CD3^+CD56^+$ -лимфоцитов, вероятно, данная популяция возрастает не только относительно, но и в абсолютном значении, чем объясняется наибольший прирост общего числа культивируемых лимфоцитов именно в данной группе сравнения (см. рис. 1). Повышенная экспрессия NKG2D-рецептора на  $CD56^+$ -клетках

**Таблица 1.** Оценка популяционного состава культивируемых лимфоцитов и экспрессии поверхностных маркеров;  $p < 0,05$   
**Table 1.** Evaluation of the population composition of cultured lymphocytes and expression of surface markers;  $p < 0,05$

Параметр Parameter	Свежевыделенные мононуклеарные клетки Fresh peripheral blood mononuclear cells	Культивирование в присутствии интерлейкина (ИЛ), день Cultivation in the presence of interleukin (IL), day									
		ИЛ-2 IL-2			ИЛ-2 + ИЛ-15 IL-2 + IL-15			ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 IL-2 + IL-15 + IL-21			
		7-й 7 <sup>th</sup>	14-й 14 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	7-й 7 <sup>th</sup>	14-й 14 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	7-й 7 <sup>th</sup>	14-й 14 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> cells, %	61,17 ± 5,2	94,46 ± 5,5	76,83 ± 6,2	57,15 ± 6,1	94,96 ± 4,9	85,31 ± 7,9	55,08 ± 6,1	95,51 ± 4,4	77,15 ± 7,9	39,74 ± 4,4	
Доля CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> cells, %	41,55 ± 4,8	47,76 ± 3,8	30,0 ± 3,1	23,97 ± 2,2	53,71 ± 4,9	30,3 ± 3,2	23,96 ± 2,2	45,01 ± 4,6	26,87 ± 2,9	20,46 ± 2,5	
Доля CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cells, %	24,79 ± 7,1	48,0 ± 5,1	64,6 ± 5,2	69,67 ± 6,7	44,1 ± 3,7	66,14 ± 6,2	68,76 ± 5,9	48,09 ± 5,0	65,8 ± 6,6	67,11 ± 6,8	
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,68 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,46 ± 0,2	0,34 ± 0,1	1,22 ± 0,8	0,46 ± 0,1	0,35 ± 0,1	0,94 ± 0,2	0,41 ± 0,1	0,3 ± 0,1	
Доля CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD56 <sup>+</sup> cells, %	14,51 ± 4,2	5,32 ± 0,8	22,27 ± 2,1	42,46 ± 4,1	4,97 ± 0,6	23,24 ± 2,1	44,57 ± 3,7	4,17 ± 0,3	21,49 ± 2,3	5968 ± 5,3	
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	9,85 ± 3,3	0,2 ± 0,1	0,18 ± 0,1	0,19 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,84 ± 0,1	0,09 ± 0,1	0,34 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,12 ± 0,2	
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	4,37 ± 1,9	5,32 ± 0,7	22,09 ± 3,3	42,27 ± 3,8	4,57 ± 0,4	22,4 ± 1,9	44,57 ± 3,5	3,83 ± 0,4	20,99 ± 2,3	58,56 ± 5,8	
Доля NKG2D <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	31,58 ± 3,8	50,07 ± 4,6	67,28 ± 6,6	77,17 ± 7,2	49,38 ± 5,1	66,65 ± 5,8	75,81 ± 7,6	50,83 ± 5,1	69,45 ± 7,0	76,85 ± 7,8	
Доля CD56 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD56 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> cells, %	12,62 ± 1,1	2,83 ± 0,5	14,82 ± 2,0	36,4 ± 3,5	2,55 ± 0,3	15,15 ± 1,6	34,18 ± 3,0	1,91 ± 0,3	14,3 ± 1,1	50,07 ± 4,4	
Доля CD3 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> cells, %	23,19 ± 2,5	49,93 ± 3,6	66,36 ± 5,4	77,0 ± 7,4	48,32 ± 4,7	66,96 ± 6,5	75,63 ± 7,1	49,9 ± 5,2	69,34 ± 6,6	75,72 ± 7,4	
Доля NKp30 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of NKp30 <sup>+</sup> cells, %	10,18 ± 1,1	10,1 ± 1,2	10,18 ± 1,1	6,54 ± 0,8	11,0 ± 1,3	10,32 ± 1,1	6,12 ± 0,7	4,91 ± 0,5	4,86 ± 0,5	2,31 ± 0,3	
Доля CD56 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD56 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> cells, %	8,53 ± 0,9	1,69 ± 0,4	3,76 ± 0,5	3,4 ± 0,5	1,7 ± 0,2	4,3 ± 0,5	3,32 ± 0,4	0,8 ± 0,1	2,39 ± 0,3	2,01 ± 0,2	
Доля CD3 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> cells, %	1,65 ± 0,3	10,1 ± 0,9	10,18 ± 1,3	6,54 ± 0,9	11,0 ± 1,4	10,34 ± 1,3	6,12 ± 0,7	4,91 ± 0,5	4,86 ± 0,5	2,31 ± 0,3	
Доля CD16 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD16 <sup>+</sup> cells, %	7,19 ± 1,4	0,27 ± 0,1	0,26 ± 0,1	0,53 ± 0,1	0,44 ± 0,1	0,41 ± 0,1	0,45 ± 0,1	1,12 ± 0,2	0,29 ± 0,1	0,43 ± 0,1	

Таблица 2. Цитотоксичность в отношении культуры HG3, %, соотношение Э:М 5:1;  $p < 0,05$ Table 2. Cytotoxicity against HG3 culture, %, E:M ratio 5:1;  $p < 0.05$ 

Показатель Indicator	Культивирование в присутствии интерлейкина (ИЛ) Cultivation in the presence of interleukin (IL)		
	ИЛ-2 IL-2	ИЛ-2 + ИЛ-15 IL-2 + IL-15	ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 IL-2 + IL-15 + IL-21
Свежевыделенные мононуклеарные клетки Fresh peripheral blood mononuclear cells	52,5 ± 4,6		
Дни культивирования Days of cultivation			
7-й 7 <sup>th</sup>	54 ± 5,7	52,7 ± 6,0	59,3 ± 6,2
14-й 14 <sup>th</sup>	70,2 ± 7,0	55,3 ± 5,8	76,8 ± 6,0
21-й 21 <sup>st</sup>	72,4 ± 5,8	60,1 ± 5,2	78,9 ± 4,6

при воздействии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 связана, по-видимому, с пропорциональным увеличением в процентном соотношении доли данной популяции. Важно отметить, что при указанном режиме культивирования наблюдается снижение экспрессии NKp30-рецептора как на CD3<sup>+</sup>-, так и на CD56<sup>+</sup>-лимфоцитах, но данная первичная культура лимфоцитов обладает наивысшей цитотоксичностью по сравнению с 2 другими анализируемыми группами. Возможно, возрастание эффекторной функции связано с пролиферацией НКТ-клеток, обладающих цитотоксичностью и экспрессирующих активационный маркер NKG2D.

Активирующее воздействие ИЛ-21 на различные популяции клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета описано в ряде отечественных и зарубежных научных публикаций [19, 20]. По данным литературы, при воздействии ИЛ-21 на НК-клетки наблюдаются их пролиферация, созревание и выживаемость, а также повышение противоопухолевой активности [21]. ИЛ-21 поддерживает пролиферацию НКТ-клеток, усиливает противоопухолевую активность и формирует долгоживущую популяцию CD62L<sup>+</sup>-НКТ-клеток [22].

Согласно полученным данным, культивирование в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 вызывает более выраженную пролиферацию клеток (по сравнению с лимфоцитами, культивируемыми в присутствии только ИЛ-2), по-видимому, пропорционально стимулируя как Т-лимфоциты, так и НКТ-клетки. Тем не менее в присутствии комбинации ИЛ-2 и ИЛ-15 наблюдается более низкая цитотоксичность культивируемых

лимфоцитов по сравнению с другими вариантами эксперимента, что может быть связано с истощением клеточной популяции [23]. Исходя из данных литературы, добавление в культуральную среду ИЛ-21 нивелирует данное отрицательное воздействие ИЛ-15 [21], что также подтверждается в нашем исследовании.

### Заключение

Таким образом, длительное культивирование в присутствии необлученных аутологических фидерных клеток обладает определенными преимуществами. Так, активированные Т-клетки положительно влияют на пролиферацию НК- и НКТ-клеток посредством продукции спектра активирующих цитокинов. Использование самого распространенного способа для *ex vivo* активации Т-клеток, МАТ к CD3- и CD28-рецепторам нацелено исключительно на активацию лимфоцитов, имеющих Т-клеточный рецептор: Т- и НКТ-клеток. Такой подход приводит к ограниченной и в процентном соотношении незначительной экспансии НК-клеток относительно пролиферации Т- и НКТ-клеток. Использование комбинации цитокинов, состоящей из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, а также длительный режим культивирования положительно влияют на пролиферацию, экспрессию активационных маркеров и выживаемость НКТ-клеток. Согласно данным научной литературы по искомой тематике, для максимально эффективного получения популяции НК-клеток требуется использование облученных фидерных клеток опухолевого происхождения либо других протоколов экспансии.

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

- Poorebrahim M., Abazari M.F., Sadeghi S. et al. Genetically modified immune cells targeting tumor antigens. *Pharmacol Ther* 2020;214:107603. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107603
- Wang X., Yang X., Yuan X. et al. Chimeric antigen receptor-engineered NK cells: new weapons of cancer immunotherapy with great potential. *Exp Hematol Oncol* 2022;11(1):85. DOI: 10.1186/s40164-022-00341-7
- Abramson J.S., Palomba M.L., Gordon L.I. et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet* 2020;396(10254):839–52. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31366-0
- Maalej K.M., Merhi M., Inchakalody V.P. et al. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Mol Cancer* 2023;22(1):20. DOI: 10.1186/s12943-023-01723-z
- Wang E., Cesano A., Butterfield L.H. et al. Improving the therapeutic index in adoptive cell therapy: key factors that impact efficacy. *J Immunother Cancer* 2020;8(2):e001619. DOI: 10.1136/jitc-2020-001619
- Liu Z., Zhou Z., Dang Q. et al. Immunosuppression in tumor immune microenvironment and its optimization from CAR-T cell therapy. *Theranostics* 2022;12(14):6273–90. DOI: 10.7150/thno.76854
- Shah N., Li L., McCarty J. et al. Phase I study of cord blood-derived natural killer cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2017;177(3):457–66. DOI: 10.1111/bjh.14570
- Khawar M.B., Sun H. CAR-NK cells: from natural basis to design for kill. *Front Immunol* 2021;12:707542. DOI: 10.3389/fimmu.2021.707542
- Peng L., Sferruzza G., Yang L. et al. CAR-T and CAR-NK as cellular cancer immunotherapy for solid tumors. *Cell Mol Immunol* 2024;21(10):1089–108. DOI: 10.1038/s41423-024-01207-0
- Shimasaki N., Jain A., Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 2020;19(3):200–18. DOI: 10.1038/s41573-019-0052-1
- Wolf B.J., Choi J.E., Exley M.A. Novel approaches to exploiting invariant NKT cells in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2018;9:384. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00384
- Peighambarzadeh F., Najafalizadeh A., Esmail N. et al. Optimization of *in vitro* expansion and activation of human natural killer cells against breast cancer cell line. *Avicenna J Med Biotechnol* 2020;12(1):17–23.
- Sivori S., Pende D., Quatrini L. et al. NK cells and ILCs in tumor immunotherapy. *Mol Aspects Med* 2021;80:100870. DOI: 10.1016/j.mam.2020.100870
- Koehl U., Brehm C., Huenneke S. et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 2013;3:118. DOI: 10.3389/fonc.2013.00118
- Conlon K.C., Lugli E., Welles H.C. et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(1):74–82. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.3329
- McMichael E.L., Jaime-Ramirez A.C., Guenterberg K.D. et al. IL-21 enhances natural killer cell response to cetuximab-coated pancreatic tumor cells. *Clin Cancer Res* 2017;23(2):489–502. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0004
- Sivonen M., Sirviö K.A., Wojciechowski S. et al. Cytokines impact natural killer cell phenotype and functionality against glioblastoma *in vitro*. *Front Immunol* 2023;14:1227064. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1227064
- Koh E.K., Lee H.R., Son W.C. et al. Antitumor effects of NK cells expanded by activation pre-processing of autologous feeder cells before irradiation in colorectal cancer. *Oncol Lett* 2023;25(6):232. DOI: 10.3892/ol.2023.13818
- Трошина Е.А. Роль цитокинов в процессах адаптивной интеграции иммунных и нейроэндокринных реакций организма. *Проблемы эндокринологии* 2021;67(2):4–9. DOI: 10.14341/probl12744
- Трошина Е.А. The role of cytokines in the processes of adaptive integration of immune and neuroendocrine reactions of the human body. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology* 2021;67(2):4–9. (In Russ.). DOI: 10.14341/probl12744
- Leonard W.J., Wan C.K. IL-21 Signaling in immunity. *F1000Res* 2016;5:F1000 Faculty Rev-224. DOI: 10.12688/f1000research.7634.1
- Shanley M., Daher M., Dou J. et al. Interleukin-21 engineering enhances NK cell activity against glioblastoma via CEBPD. *Cancer Cell* 2024;42(8):1450–66.e11. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.07.007
- Liu Y., Dang Y., Zhang C. et al. IL-21-armored B7H3 CAR-iNKT cells exert potent antitumor effects. *iScience* 2023;27(1):108597. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108597
- Felices M., Lenvik A.J., McElmurry R. et al. Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect. *JCI Insight* 2018;3(3):e96219. DOI: 10.1172/jci.insight.96219

**Вклад авторов**

П.О. Фёдорова: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

И.О. Чикилева: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи.

**Author's contributions**

P.O. Fedorova: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;

I.O. Chikileva: research design development, analysis of the obtained data (including statistical), review of publications on the topic of the article.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

П.О. Фёдорова / P.O. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>

И.О. Чикилева / I.O. Chikileva: <https://orcid.org/0000-0003-0769-1695>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования данной экспериментальной работы.

**Funding.** The authors declare no funding for this experimental work.

**Статья поступила:** 21.01.2025. **Принята в печать:** 13.05.2025. **Опубликована онлайн:** 27.06.2025.

**Article submitted:** 21.01.2025. **Accepted for publication:** 13.05.2025. **Published online:** 27.06.2025.

# Скрининг фитокомпонентов для разработки онкопротектора

О.А. Бочарова<sup>1</sup>, А.А. Аксенов<sup>1</sup>, Р.В. Карпова<sup>1</sup>, Е.В. Бочаров<sup>1</sup>, Н.Н. Касаткина<sup>1</sup>, И.В. Казеев<sup>1</sup>,  
М.В. Уткина<sup>1</sup>, В.Г. Кучеряну<sup>2</sup>, В.С. Косоруков<sup>1</sup>, И.С. Стилиди<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

**Контакты:** Регина Васильевна Карпова [planta39@rambler.ru](mailto:planta39@rambler.ru)

**Введение.** Лекарственные растения обладают высоким химиопрофилактическим потенциалом в онкологии. Структурное разнообразие биологически активных веществ, входящих в их состав, например фенольных соединений (простых фенолов, флавоноидов, фенольных кислот, дубильных веществ и др.), терпеноидов (моно-, дитерпеноидов, тритерпеновых сапонинов и др.), эфирных масел, обуславливает широкий спектр их противоопухолевой активности. Комплексные растительные препараты более эффективны и безопасны благодаря их многоцелевому воздействию на различные регуляторные механизмы в сочетании с относительно низкой токсичностью. Разработка эффективных растительных фармацевтических композиций на основе структурного разнообразия биологически активных веществ представляется актуальной.

**Цель исследования** – изучение антипролиферативного эффекта ряда растительных экстрактов в отношении клеток аденокарциномы яичников человека линии CaOv и отбор потенциальных фитокомпонентов для создания новой противоопухолевой фармацевтической композиции.

**Материалы и методы.** Антипролиферативную активность растительных экстрактов оценивали радиометрическим методом по уровню включения <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток аденокарциномы яичников человека CaOv. Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) вычисляли с применением пробит-анализа. Выбор растительного масла в качестве оптимального экстрагента экспериментального состава фитокомпозиции проводили на самцах мышей линии C57BL/6 по влиянию на заживление раневой поверхности.

**Результаты.** Исследована антипролиферативная активность экстрактов 27 лекарственных растений. По показателю IC<sub>50</sub> отобраны 14 наиболее эффективных в данных условиях. На основании ранозаживляющего эффекта отдельных растительных масел (льняного, подсолнечного, кукурузного), а также соответствующих масляных экстрактов фитокомпозиции в качестве фармакологически приемлемого экстрагента выбрано льняное масло.

**Заключение.** Отобранные фитокомпоненты могут послужить основой для формирования оптимального состава новой растительной фармацевтической композиции как химиопрофилактического лекарственного средства в онкологии. Обоснован выбор льняного масла в качестве экстрагента для получения масляного экстракта экспериментальной фитокомпозиции.

**Ключевые слова:** фитокомпозиция, клеточная линия CaOv, концентрация полумаксимального ингибирования, онкология

**Для цитирования:** Бочарова О.А., Аксенов А.А., Карпова Р.В. и др. Скрининг фитокомпонентов для разработки онкопротектора. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):32–40.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-32-40>

## Phytocomponents screening for oncoprotector development

Olga A. Bocharova<sup>1</sup>, Andrey A. Aksyonov<sup>1</sup>, Regina V. Karpova<sup>1</sup>, Evgeny V. Bocharov<sup>1</sup>, Natalia N. Kasatkina<sup>1</sup>, Ilya V. Kazeev<sup>1</sup>,  
Marina V. Utkina<sup>1</sup>, Valerian G. Kucheryanu<sup>2</sup>, Vyacheslav S. Kosorukov<sup>1</sup>, Ivan S. Stilidi<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

**Contacts:** Regina Vasilievna Karpova [planta39@rambler.ru](mailto:planta39@rambler.ru)

**Background.** Medicinal plants have a high chemopreventive potential in oncology. The structural diversity of plant biologically active substances: phenolic compounds (simple phenols, flavonoids, phenolic acids, tannins, etc.), terpenoids (mono-, diterpenoids, triterpene saponins, etc.), essential oils, for example, results in a wide range of antitumor activity. Complex herbal preparations are more effective and safe due to their multi-target effects on various regulatory mechanisms in combination with relatively low toxicity. The development of effective natural pharmaceutical compositions based on the structural diversity of biologically active substances seems relevant.

**Aim.** Number plant extracts antiproliferative effect against CaOv human ovarian adenocarcinoma cells investigation and potential phytocomponents selection for the novel antitumor pharmaceutical composition development.

**Materials and methods.** CaOv human ovarian adenocarcinoma cell line was used as a test model. The antiproliferative effect of plant extracts was measured by the radiometric method based on the  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation into CaOv cells DNA. Half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated using probit analysis. The selection of vegetable oil as an optimal extraction agent was carried out on C57BL/6 male mice based on the wound healing effect.

**Results.** The antiproliferative activity of 27 medical plant extracts was studied. The 14 most effective ones in these conditions were selected based on the  $\text{IC}_{50}$ . Linseed oil was chosen as an optimal extraction agent considered the wound-healing effect of individual vegetable oils (linseed, sunflower, corn), as well as the corresponding oil extracts of the phytocomposition.

**Conclusion.** The selected phytocomponents can be used as a foundation for an optimal compound development of a new pharmaceutical composition aimed at chemoprevention in cancer care. The choice of linseed vegetable oil as an experimental phytocomposition extractant is justified.

**Keywords:** herbal formula, CaOv cell line, half maximal inhibitory concentration, oncology

**For citation:** Bocharova O.A., Aksyonov A.A., Karpova R.V. et al. Phytocomponents screening for oncoprotector development. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):32–40. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-32-40>

## Введение

Лекарственные растения обладают высоким химиопрофилактическим потенциалом в онкологии. Структурное разнообразие биологически активных веществ, входящих в их состав, например фенольных соединений (простых фенолов, флавоноидов, фенольных кислот, дубильных веществ и др.), терпеноидов (моно-, diterпеноидов, тритерпеновых сапонинов и др.), эфирных масел, обуславливает широкий спектр их противоопухолевой активности, включая антипролиферативные, антимутагенные, антиметастатические, проапоптотические, антиоксидантные, иммуномодулирующие свойства. Комплексные растительные препараты более эффективны и безопасны благодаря их многоцелевому воздействию на различные регуляторные механизмы в сочетании с относительно низкой токсичностью [1, 2].

Оптимального сочетания растительных компонентов можно достичь при суммировании однонаправленных свойств, а также компенсации или нейтрализации неблагоприятных. Включение в состав фитоформулы нескольких растений (в частности, адаптогенов) одной направленности действия позволяет повысить ее эффективность. Комбинации растений обеспечивают уникальные эффекты, которые невозможно получить ни с одним ингредиентом в отдельности [3, 4].

Разработка новых эффективных фармацевтических композиций на основе структурного разнообразия биологически активных веществ представляется актуальной.

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 9-е место в структуре онкопатологий у мужчин и 17-е место у женщин в мире [5]. На момент обращения у 75–80 % пациентов определяют немышечно-инвазивные формы РМП [6].

«Золотым стандартом» лечения немышечно-инвазивного РМП остается трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря (МП). Для профилактики рецидива и снижения прогрессирования заболевания проводят адъювантную химио- или иммунотерапию вакциной *Bacillus Calmette–Guérin* (БЦЖ). Так, проведение внутрипузырной инстилляции БЦЖ-вакцины после трансуретральной резекции опухоли МП позволяет в 3–4 раза уменьшить частоту рецидивов по сравнению с только оперативным лечением [7]. Однако внутрипузырная БЦЖ-терапия может сопровождаться рядом побочных эффектов и осложнений (циститами, гранулемами, сепсисом с очагами туберкулезного воспаления в различных органах), а организм 20–40 % больных РМП не отвечает на терапию БЦЖ [8]. Токсичность химиотерапии и осложнения БЦЖ-терапии заставляют искать альтернативные средства химиопрофилактики рецидивов РМП [9].

В предыдущих исследованиях в НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина разработана фармацевтическая композиция — нетоксичный мультифитоадаптоген (МФА), содержащий компоненты экстрактов 40 растений, в том числе адаптогенов (женьшеня, родиолы розовой, элеутерококка, аралии, лимонника и др.). МФА проявил противоопухолевые, антиоксидантные, антимутагенные, иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные и интерферогенные, гормономодулирующие, нейропротекторные свойства.

**Целью работы** было исследование антипролиферативного эффекта ряда растительных экстрактов в отношении клеток аденокарциномы яичников человека линии CaOv и отбор потенциальных фитокомпонентов для создания новой противоопухолевой фармацевтической композиции.

### Материалы и методы

Водно-спиртовые экстракты изготовлены из сертифицированного растительного сырья. Экстракцию проводили 33 % этиловым спиртом по авторской технологии [10].

Антипролиферативную активность растительных экстрактов оценивали радиометрическим методом по подавлению включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток аденокарциномы яичников человека линии CaOv (далее CaOv).

Клетки культивировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$  в среде RPMI 1640 (компания «ПанЭко», Россия) с добавлением 1 мг/мл глутамина, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. По 1 мл клеточной суспензии ( $1 \times 10^5$  кл/мл) разливали в пенициллиновые флаконы. Культуральную среду удаляли, в опытные флаконы вносили по 1 мл свежей среды, содержащей растительные экстракты в концентрациях 25, 50 и 100 мкл/мл среды соответственно. В контрольные флаконы — по 1 мл свежей среды. В спиртовой контроль в среду добавляли 33 % этиловый спирт в концентрациях 25, 50 и 100 мкл/мл среды соответственно. Флаконы помещали в термостат на 24 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$ . За 1 ч до окончания экспозиции с экстрактами во флаконы вносили  $^3\text{H}$ -тимидин (1 мкCi/мл). Затем среду удаляли, клетки дважды промывали ледяным фосфатным буферным солевым раствором и лизировали 2,5 % раствором хлорной кислоты. Клеточные лизаты (0,1 мл) переносили в сцинтилляционные флаконы и добавляли 3 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8 («Гранхим», Россия). Уровень радиоактивности (Dpm) определяли на жидкостном сцинтилляционном  $\beta$ -счетчике RackBeta (LKB Wallas, США). Достоверных различий спиртового контроля и контроля не выявлено, поэтому эти данные были объединены в общий контроль.

Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК опухолевых клеток выражали в процентах от контроля — среднее значение Dpm в образцах, обработанных растительными экстрактами, по сравнению с контрольными образцами. Для каждого исследуемого экстракта было проведено по 3 эксперимента, каждый из которых проводили в трех повторностях.

Антипролиферативный эффект растительных экстрактов оценивали по  $\text{IC}_{50}$  (концентрации, вызывающей 50 % подавление включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток). Для вычисления  $\text{IC}_{50}$  применяли пробит-анализ. В качестве препарата сравнения использовали цитостатический агент циклоплатам в концентрациях 0,25; 0,5 и 1 мкг/мл.

Разрабатываемая фитокомпозиция предлагается в виде масляного экстракта для местного применения. Для выбора растительного масла в качестве фармацевтически приемлемого экстрагента оценивали воздействие растительных масел, а также масляных экстрактов экспериментального состава фитокомпозиции на заживление ран мышей. Использовали подсолнечное (ГОСТ 1129–2013), кукурузное (ГОСТ 8808–2000) и льняное (ГОСТ 35012–2023) растительные масла. На основе масел приготовлены 3 масляных экстракта экспериментального состава фитокомпозиции по авторской технологии и обозначены фитоподсолнечный, фитокукурузный и фитольняной соответственно [11].

Влияние масляных экстрактов на заживление ран оценивали на самцах мышей линии C57BL/6 массой тела 20–22 г из разведения НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все процедуры с участием животных были проведены с соблюдением этических норм и одобрены комиссией по биоэтике НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (протокол № 08a-p-22 от 13.12.2022).

Группы животных (по 5 особей в каждой): 1-я группа — контроль, раны без какого-либо воздействия; 2, 3 и 4-я группы — проводили обработку раны подсолнечным, кукурузным, льняным маслом соответственно; 5, 6 и 7-я группы — обработка раны фитоподсолнечным, фитокукурузным, фитольняным экстрактами соответственно.

Перед нанесением экспериментальной раны животных наркотизировали, используя препарат Ксиланит (1 мг/кг веса животного, «Нита-Фарм», Россия), обладающий миорелаксantным и анестезирующим действиями. Препарат вводили внутримышечно, через 3–5 мин после наступления устойчивой наркотизации проводили депиляцию (кремом EVELINE) шерстного покрова. На бедре правой задней лапы стерильным скальпелем выполняли разрез кожи до мышечного слоя.

Подсчитывали условную площадь раны (ширина  $\times$  длина). В среднем размеры начального повреждения

составили  $4 \times 4$  мм. Обработку ран начинали в тот же день и проводили 1 раз в день в течение 9 дней. Каждый день (с 1-го по 10-й) измеряли ширину и длину раны, подсчитывали площадь и выражали ее значение в процентах от исходной.

Статистический анализ данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Результаты представлены в виде средних арифметических значений ( $\pm$  ошибка среднего). Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Скрининг компонентов фитокомпозиции проводили на основе состава ранее разработанного и изученного МФА. Последний содержит широкий спектр биологически активных веществ: фенольные соединения (простые фенолы, фенилпропаноиды, флавоноиды, лигнаны), тритерпеновые сапонины, компоненты эфирных масел (моно-, дитерпеноиды) и др. [12].

Для наибольшей эффективности лечебного воздействия при внутрипузырных инстилляциях при РМП необходим длительный контакт лекарственного средства с эпителием слизистой оболочки МП. Именно поэтому целесообразным представляется разработка фитокомпозиции масляной консистенции.

В связи с этим из состава МФА прежде всего были отобраны растения, содержащие жирорастворимые соединения — жирные кислоты и компоненты эфирных масел.

Жирные кислоты содержатся:

- в плодах шиповника, боярышника, можжевельника, кориандра, лимонника, черной смородины, калины;
- корнях солодки, женьшеня, валерианы, одуванчика, родиолы розовой, лапчатки, элеутерококка;
- почках березы, сосны;
- цветках ромашки, травы тысячелистника и череды [13–17].

Компоненты эфирных масел содержатся в 17 растениях, входящих в состав МФА (по результатам собственных исследований и по данным литературы), это:

- почки березы, сосны;
- цветки календулы, пижмы, ромашки;
- трава душицы, зверобоя, тысячелистника, тимьяна;
- листья мяты, эвкалипта;
- плоды клюквы, кориандра, лимонника, можжевельника;
- корни валерианы, солодки [18–19].

Таким образом, в данное исследование включили 27 растений из состава МФА (табл. 1), содержащих

**Таблица 1.** Растения, содержащие жирорастворимые соединения  
**Table 1.** Plants containing fat-soluble compounds

Растение Plant	Жирорастворимые соединения Fat-soluble compounds
Можжевельник обыкновенный <i>Juniperus communis</i> L.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Зверобой продырявленный <i>Hypericum perforatum</i> L.	Эфирные масла Essential oils
Пижма обыкновенная <i>Tanacetum vulgare</i> L.	Эфирные масла Essential oils
Шиповник коричный <i>Rosa cinnamomea</i> L.	Жирные кислоты Fatty acid
Лапчатка прямостоячая <i>Potentilla erecta</i> L.	Жирные кислоты Fatty acid
Родиола розовая <i>Rhodiola rosea</i> L.	Жирные кислоты Fatty acid
Солодка голая <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Мята перечная <i>Mentha piperita</i> L.	Эфирные масла Essential oils
Валериана лекарственная <i>Valeriana officinalis</i> L.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Душица обыкновенная <i>Origanum vulgare</i> L.	Эфирные масла Essential oils
Женьшень настоящий <i>Panax ginseng</i> C.A. Mey	Жирные кислоты Fatty acid
Эвкалипт прутовидный <i>Eucalyptus viminalis</i> Labill.	Эфирные масла Essential oils
Сосна обыкновенная <i>Pinus sylvestris</i> L.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Элеутерококк колючий <i>Eleutherococcus senticosus</i> Rupr. et Makino Maxim.	Жирные кислоты Fatty acid
Береза повислая <i>Betula pendula</i> Roth	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Ромашка лекарственная <i>Matricaria chamomilla</i> L.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Боярышник обыкновенный <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Жирные кислоты Fatty acid
Лимонник китайский <i>Schizandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Клюква обыкновенная <i>Oxycoccus palustris</i>	Эфирные масла Essential oils

Окончание табл. 1  
End of table 1

Растение Plant	Жирорастворимые соединения Fat-soluble compounds
Календула лекарственная <i>Calendula officinalis</i> L.	Эфирные масла Essential oils
Тысячелистник обыкновенный <i>Achillea millefolium</i> L.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Кориандр посевной <i>Coriandrum sativum</i> L.	Жирные кислоты, эфирные масла Fatty acid, essential oils
Тимьян ползучий <i>Thymus serpyllum</i> L.	Эфирные масла Essential oils
Калина обыкновенная <i>Viburnum opulus</i> L.	Жирные кислоты Fatty acid
Черда трехраздельная <i>Bidens tripartita</i> L.	Жирные кислоты Fatty acid
Одуванчик лекарственный <i>Taraxacum officinale</i> Wigg	Жирные кислоты Fatty acid
Смородина черная <i>Ribes nigrum</i> L.	Жирные кислоты Fatty acid

жирные кислоты, компоненты эфирных масел или то и другое, способные извлекаться как водно-спиртовыми, так и масляными экстрагентами [20, 21].

Исследования показали, что изучаемые экстракты обладали разным воздействием на пролиферацию клеток СаОv.

У 18 изученных экстрактов (плодов можжевельника, шиповника, боярышника, лимонника; травы зверобоя, душицы; цветков пижмы, цветков ромашки; корней лапчатки, родиолы розовой, солодки, элеутерококка, женьшеня, валерианы; листьев мяты, эвкалипта; почек сосны, березы) с увеличением концентрации экстракта в среде инкубации уровень включения  $^3\text{H}$ -тимидина снижался, т.е. увеличивалось подавление синтеза ДНК опухолевых клеток. Для примера на рис. 1 представлены зависимости уровня включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток СаОv от концентрации в среде инкубации экстрактов плодов можжевельника или корней родиолы розовой.

На рис. 2 приведены значения  $\text{IC}_{50}$  для 18 экстрактов в сравнении с циклоплатомом. Как видно из рис. 2, максимальный антипролиферативный эффект выявлен у циклоплатама ( $\text{IC}_{50} = 5$  мкг/мл). Среди растительных экстрактов наибольший антипролиферативный эффект выявлен у экстракта плодов можжевельника ( $\text{IC}_{50} = 200$  мкг/мл). Для других исследованных экстрактов  $\text{IC}_{50}$  составило от 250 до 10 000 мкг/мл.

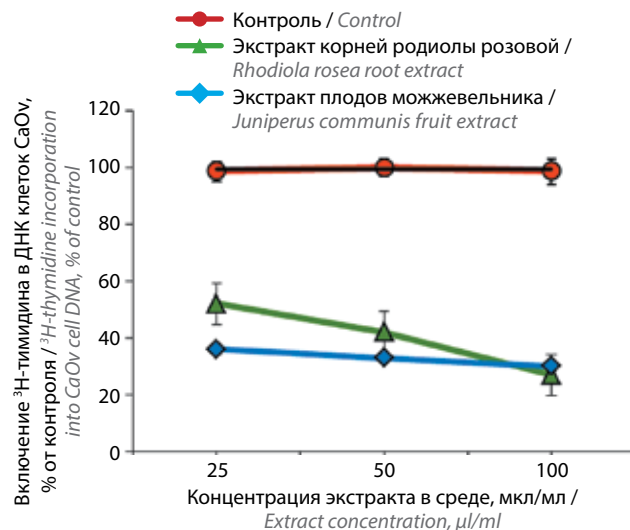


Рис. 1. Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток линии СаОv, обработанных экстрактом корней родиолы розовой или плодов можжевельника

Fig. 1.  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation into the CaOv cells DNA treated with *Rhodiola rosea* L. root extract or *Juniperus communis* L. fruits extract

Наименее эффективными оказались экстракты корней элеутерококка ( $\text{IC}_{50} = 2000$  мкг/мл), цветков ромашки ( $\text{IC}_{50} = 2000$  мкг/мл), плодов боярышника ( $\text{IC}_{50} = 4000$  мкг/мл) и плодов лимонника ( $\text{IC}_{50} = 10\,000$  мкг/мл).

У 6 растительных экстрактов (травы тысячелистника, тимьяна, череды; корней одуванчика; плодов кориандра, черной смородины) антипролиферативный эффект не был выявлен. Во всех исследованных концентрациях уровень включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток СаОv не отличался от контроля. Для примера на рис. 3 представлены графики зависимости уровня включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток СаОv от концентрации в среде инкубации экстрактов травы тысячелистника и плодов кориандра.

Для 3 растительных экстрактов (плодов калины, клюквы и цветков календулы) выявлена прямая зависимость включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК опухолевых клеток от концентрации экстракта в среде инкубации. С увеличением концентрации экстракта в среде инкубации торможение пролиферативной активности клеток СаОv снижалось. Для примера на рис. 4 представлены графики зависимости уровня включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток СаОv от концентрации экстрактов плодов клюквы и цветков календулы в среде инкубации.

На основании полученных результатов неперспективными оказались 4 компонента с наиболее низкой антипролиферативной активностью (ромашка, элеутерококк, боярышник, лимонник), 6 компонентов, не влияющих на пролиферативную активность опухолевых клеток (тысячелистник, кориандр, чабрец, череда, одуванчик, черная смородина), а также

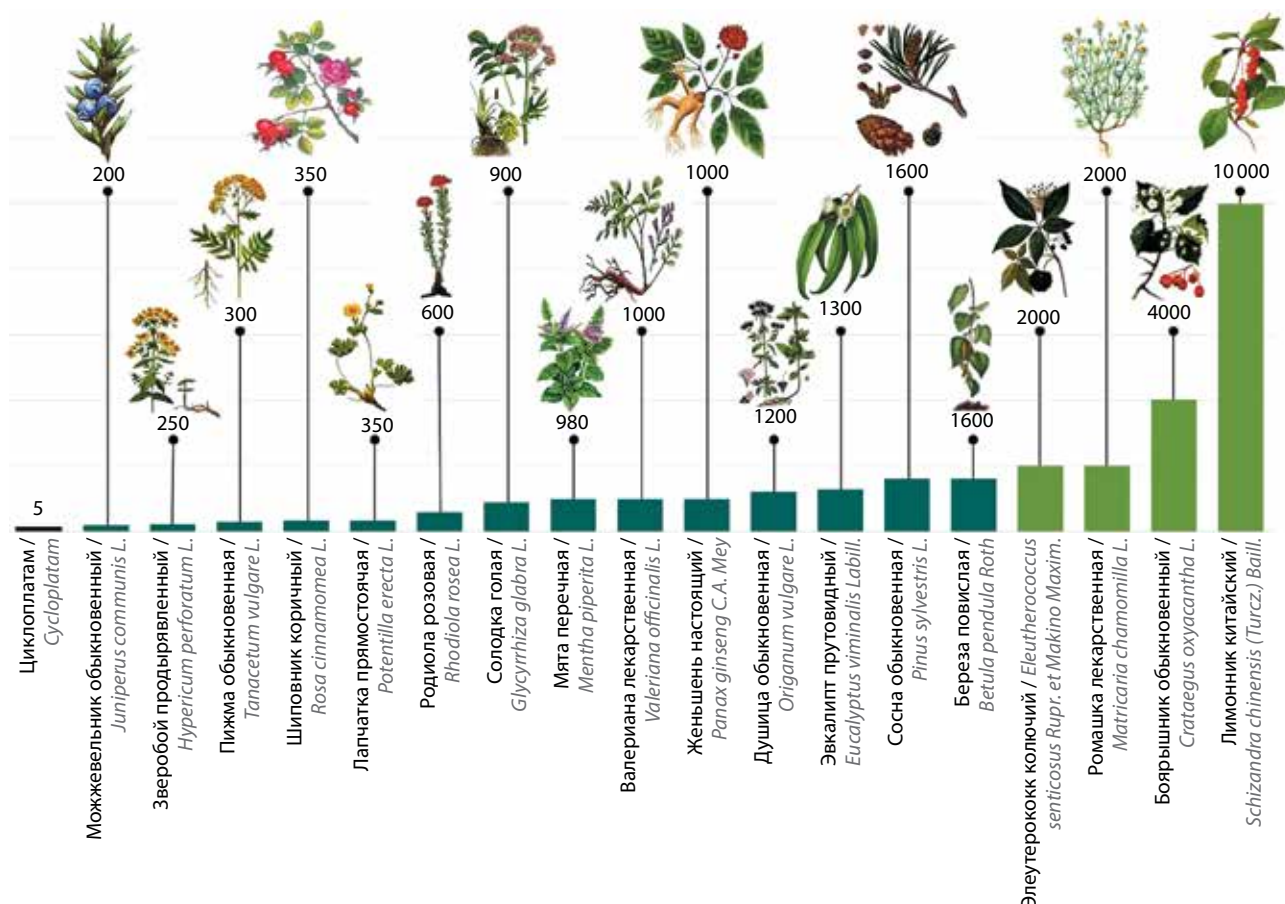


Рис. 2. Концентрация полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) растительных экстрактов, мкг/мл ( $IC_{50}$  циклоплатамы — 5 мкг/мл)

Fig. 2. Plant extracts half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ), µg/ml (cycloplata  $IC_{50}$ —5 µg/ml)

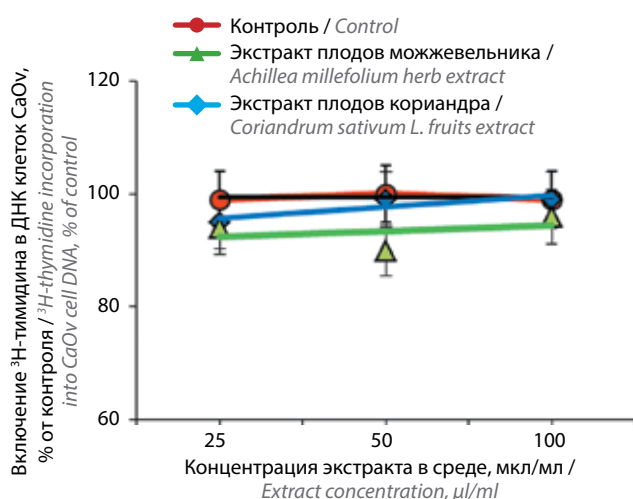


Рис. 3. Включение  $^3H$ -тимидина в ДНК клеток линии CaOv, обработанных экстрактом плодов кориандра или травы тысячелистника

Fig. 3.  $^3H$ -thymidine incorporation into the CaOv cells DNA treated with *Coriandrum sativum* L. fruits extract or *Achillea millefolium* herb extract

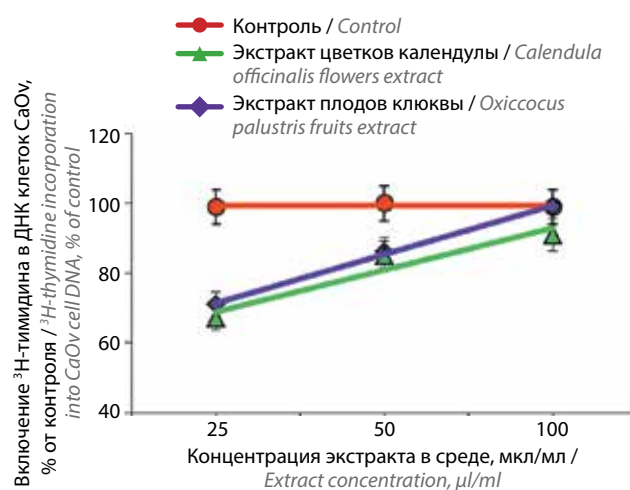
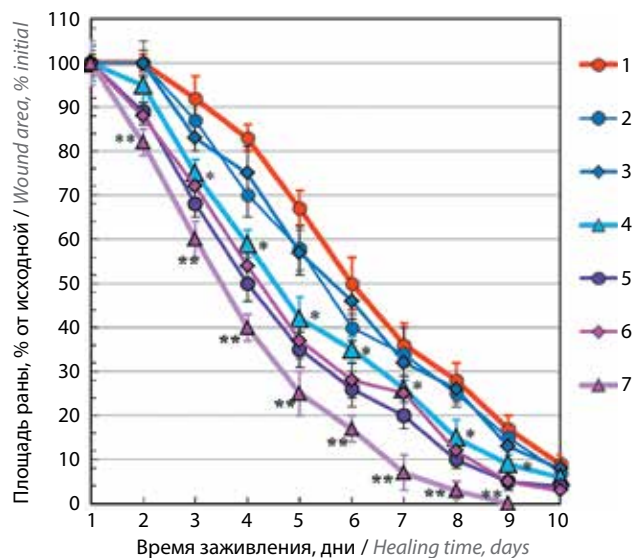


Рис. 4. Включение  $^3H$ -тимидина в ДНК клеток линии CaOv, обработанных экстрактом плодов клюквы и цветков календулы

Fig. 4.  $^3H$ -thymidine incorporation into the CaOv cells DNA treated with *Oxycoccus palustris* fruits extract or *Calendula officinalis* flowers extract

3 компонента, у которых с увеличением концентрации включение  $^3H$ -тимидина в ДНК опухолевых клеток повышалось (клюква, калина, календула).

Таким образом, для формирования новой противоопухолевой фармакокомпозиции отобрано 14 растительных компонентов: плоды можжевельника,



**Рис. 5.** Заживление ран под воздействием различных растительных масел и фитомасляных экстрактов. Группы: 1 – контроль; 2 – подсолнечное масло; 3 – кукурузное масло; 4 – льняное масло; 5 – фито-подсолнечный экстракт; 6 – фитокукурузный экстракт; 7 – фито-льняной экстракт.

\* $p < 0,05$  (по сравнению с контролем); \*\* $p < 0,05$  (по сравнению с контролем и льняным маслом).

**Fig. 5.** Wound healing under the various vegetable oils and phyto-oil extracts impact. Groups: 1 – control; 2 – sunflower oil; 3 – corn oil; 4 – linseed oil; 5 – phyto-sunflower extract; 6 – phyto-corn extract; 7 – phyto-linseed extract.

\* $p < 0.05$  (compared with the control); \*\* $p < 0.05$  (compared with the control and linseed oil).

шиповника; корни лапчатки, родиолы розовой, женьшеня, солодки, валерианы; трава зверобоя, душицы; цветки пижмы; листья мяты, эвкалипта; почки сосны, березы.

На рис. 5 графически представлены результаты воздействия отдельных растительных масел (подсолнечного, кукурузного и льняного), а также масляных фитоэкстрактов на заживление экспериментальных ран у мышей – зависимость площади раны от времени.

Из рисунка видно, что у животных 1-й группы (контрольные мыши) процесс заживления начался

на 3-й день (рана зажила на 8 %). На 10-й день эксперимента зажил 91 % площади раны.

Динамика заживления раны под воздействием подсолнечного (2-я группа) и кукурузного (3-я группа) масел аналогична контролю. Воздействие льняного масла (4-я группа) оказалось более эффективным по сравнению с другими маслами. Рана сократилась на 5 % уже на 2-й день. Площадь раны с 3-го по 10-й день эксперимента статистически достоверно была меньше по сравнению с контролем. На 10-й день заживление составило 94 %.

Изменение параметра заживления под воздействием фито-подсолнечного (5-я группа) и фитокукурузного (6-я группа) экстрактов сравнима с льняным маслом. Уменьшение раны началось на 2-й день (на 11 и 12 % соответственно), что немного лучше действия льняного масла. На 10-й день у мышей этих групп наблюдали более высокий показатель сокращения ран (96 и 97 % соответственно).

У мышей 7-й группы (фито-льняной экстракт) уже на 2-й день раны сократились на 18 %, и на всем протяжении эксперимента площадь раны была статистически достоверно ниже по сравнению как с контрольными животными, так и с особями, обработанными льняным маслом. Полное заживление ран наблюдали на 9-й день эксперимента.

Таким образом, наилучший эффект был зарегистрирован у фито-льняного экстракта. В результате в качестве экстрагента экспериментальной фитокомпозиции было выбрано льняное масло.

## Заключение

Отобранные фитокомпоненты могут послужить основой для формирования оптимального состава новой растительной фармацевтической композиции в качестве химиопрофилактического лекарственного средства в онкологии. Выбор льняного растительного масла в качестве экстрагента для получения масляного экстракта экспериментальной фитокомпозиции основан на его лучшем эффекте заживления экспериментальной раны.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kubczak M., Szustka A., Rogalińska M. Molecular targets of natural compound with anticancer properties. *Int J Mol Sci* 2021;22(24):136–45. DOI: 10.3390/ijms222413659
- Khan A.W., Farooq M., Haseeb M., Choi S. Role of plant-derived active constituents in cancer treatment and their mechanisms of action. *Cells* 2022;11(8):1326. DOI: 10.3390/cells11081326
- Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Изыскание фитоадаптогенов и возможности использования фитокомпозиций. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(4):35–44. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-35-44

Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Research of new phytoadaptogens and possibilities of herbal formulas application. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal*

- of Biotherapy 2020;19(4):35–44. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-35-44
4. Panossian A. Challenges in phytotherapy research. *Front Pharmacol* 2023;14:1199516. DOI: 10.3389/fphar.2023.1199516
  5. Zhang Y., Rumgay H., Li M. et al. The global landscape of bladder cancer incidence and mortality in 2020 and projections to 2040. *J Glob Health* 2023;13:04109. DOI: 10.7189/jogh.13.04109
  6. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.  
Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O., eds. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITs radiologii” Minzdrava Rossii, 2021. 252 p. (In Russ.).
  7. Han J., Gu X., Li Y., Wu Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer – current understanding and prospect. *Biomed Pharmacother* 2020;129:110393. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110393
  8. Larsen E.S., Joensen U.N., Poulsen A.M. et al. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. *APMIS* 2020;128(2):92–103. DOI: 10.1111/apm.13011
  9. Lidagoster S., Ben-David R., De Leon B., Sfakianos J.P. BCG and alternative therapies to BCG therapy for non-muscle-invasive bladder cancer. *Curr Oncol* 2024;31(2):1063–78. DOI: 10.3390/curroncol31020079
  10. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Голубева В.А. и др. Оценка антиметастатической и иммуномодулирующей активности препарата Фитомикс-40 в эксперименте *in vivo*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1999;128(10):403–07.  
Bocharova O.A., Karpova R.V., Golubeva V.A. et al. Evaluation of the antimetastatic and immunomodulating activity of the preparation Phytomix-40 in the *in vivo* experiment. *Bulleten eksperimentalnoy biologii y meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 1999;128(10):403–7. (In Russ.).
  11. Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Барышникова М.А. и др. Фармацевтическая композиция, проявляющая цитотоксическое действие в отношении клеток рака мочевого пузыря человека. Патент РФ № 2693378 от 02.07.2019. Бюл. №19.  
Bocharova O.A., Matveev V.B., Baryshnikova M.A. et al. Pharmaceutical composition showing cytotoxic action against human bladder cancer cells. Russian Federation Patent No.2693378 of 02.07.2019. Bulletin No. 19. (In Russ.).
  12. Бочарова О.А., Казеев И.В., Шевченко В.Е. и др. Методологические подходы к стандартизации фитоадаптогенов. Методическое руководство. М., 2022. 98 с.  
DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-28  
Bocharova O.A., Kazeev I.V., Shevchenko V.E. et al. Methodological approaches to standardization of phytoadaptogens. Methodological guidelines. Moscow, 2022. 98 p. (In Russ.). DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-28
  13. Hao F., Deng X., Yu X., Wang W. et al. *Taraxacum*: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological activity. *Am J Chin Med* 2024;52(1):183–215. DOI: 10.1142/S0192415X24500083
  14. Lahlou A., Lyashenko S., Chihlel-Chelh T. et al. Fatty acid profiling in the genus *Pinus* in relation to its chemotaxonomy and nutritional or pharmaceutical properties. *Phytochemistry* 2023;206:113517. DOI: 10.1016/j.phytochem.2022.113517
  15. Gonçalves A.C., Flores-Félix J.D., Coutinho P. et al. Zimbrow (*Juniperus communis* L.) as a promising source of bioactive compounds and biomedical activities: a review on recent trends. *Int J Mol Sci* 2022;23(6):3197. DOI: 10.3390/ijms23063197
  16. Ak G., Gevrenova R., Sinan K.I. et al. *Tanacetum vulgare* L. (Tansy) as an effective bioresource with promising pharmacological effects from natural arsenal. *Food Chem Toxicol* 2021;153:112268. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112268
  17. Michels B., Franke K., Weiglein A. et al. Rewarding compounds identified from the medicinal plant *Rhodiola rosea*. *J Exp Biol* 2020;223(Pt 16):jeb223982. DOI: 10.1242/jeb.223982
  18. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Определение химического состава летучих соединений фитоадаптогена Фитомикс-40 методом хромато-масс-спектрометрии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2008;5:18–28.  
Sheichenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Chemical composition determination of volatile compounds of the phytoadaptogen Fitomix-40 by chromatomass-spectrometry. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry 2008;5:18–28. (In Russ.).
  19. Groot A.C., Schmidt E. Essential Oils. Part III: Chemical composition. *Dermatitis* 2016;27(4):161–9. DOI: 10.1097/DER.000000000000193
  20. Sut S., Maccari E., Zengin G. et al. “Smart extraction chain” with green solvents: extraction of bioactive compounds from *Picea abies* bark waste for pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic uses. *Molecules* 2022;27(19):6719. DOI: 10.3390/molecules27196719
  21. Câmara J.S., Perestrelo R., Ferreira R. et al. Terpenoids: a plethora of bioactive compounds with several health functions and industrial applications – a comprehensive overview. *Molecules* 2024;29(16):3861. DOI: 10.3390/molecules29163861

#### Вклад авторов

О.А. Бочарова: разработка дизайна исследования, планирование работы, анализ данных, анализ рукописи;  
А.А. Аксенов, Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров: получение и анализ данных, написание текста рукописи, оформление рукописи;  
Н.Н. Касаткина, М.В. Уткина: получение данных;  
И.В. Казеев: оформление рукописи;  
В.Г. Кучеряну: анализ данных;  
В.С. Косоруков, И.С. Стилиди: анализ и редактирование рукописи.

#### Authors' contributions

O.A. Bocharova: development of research design, work planning, data analysis, manuscript analysis;  
A.A. Aksyonov, R.V. Karpova, E.V. Bocharov: data acquisition and analysis, manuscript writing, manuscript design;  
I.V. Kazeev: manuscript design;  
N.N. Kasatkina, M.V. Utkina: data acquisition;  
V.G. Kucheryanu: data analysis;  
V.S. Kosorukov, I.S. Stilidi: analysis and editing the manuscript.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

О.А. Бочарова / O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>

А.А. Аксенов / A.A. Aksyonov: <https://orcid.org/0000-0001-6052-2132>

Р.В. Карпова / R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>

Е.В. Бочаров / E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>

Н.Н. Касаткина / N.N. Kasatkina: <https://orcid.org/0000-0002-4735-977X>

М.В. Уткина / M.V. Utkina: <https://orcid.org/0009-0009-0483-5332>

И.В. Казеев / I.V. Kazeev: <https://orcid.org/0000-0002-6100-3470>

В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания № 123022100036-8 по теме «Экспериментальная разработка новых лекарственных средств для терапии злокачественных опухолей».

**Funding.** The study was performed within the framework of the State Task No. 123022100036-8 “Experimental development of new medicines for the treatment of malignant tumors”.

**Соблюдение правил биоэтики.** Все процедуры с участием животных были проведены с соблюдением этических норм и одобрены комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (протокол № 08а-р-22 от 13.12.2022).

**Compliance with principles of bioethics.** All procedures involving animals were carried out in compliance with ethical standards and approved by the Bioethics Commission of the N.N. Blokhin National Research Medical Center of Oncology (Protocol No. 08a-r-22 dated 13.12.2022).

Статья поступила: 19.08.2024. Принята в печать: 25.04.2025. Опубликовано онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 19.08.2024. Accepted for publication: 25.04.2025. Published online: 27.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-41-47>

# Доклинические характеристики дуплексов миРНК в качестве таргетных адъювантов при злокачественном росте

Е.М. Трещалина<sup>1</sup>, Г.Б. Смирнова<sup>1</sup>, А.Ю. Кузеванова<sup>2</sup>, С.Ш. Каршиева<sup>1</sup>, М.В. Киселевский<sup>1</sup>,  
А.В. Карпукхин<sup>2</sup>, М.А. Маслов<sup>3</sup>, А.А. Алимов<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, пр-кт Вернадского, 78

**Контакты:** Елена Михайловна Трещалина [treshalina@yandex.ru](mailto:treshalina@yandex.ru)

**Введение.** Известно, что малые, или короткие, двухцепочечные интерферирующие РНК – миРНК (small interfering RNA, siRNA) длиной 20–25 нуклеотидов – способны адресно блокировать неконтролируемую злокачественную пролиферацию клеток. В качестве генов-мишеней рассматриваются ингибиторы апоптоза, в том числе клеточный гликопротеин CD47 (cluster of differentiation 47), и гены репликативного комплекса, регулирующие клеточный цикл в S-фазе. Это обуславливает актуальность исследования на опухолевых моделях, направленных на эти мишени миРНК в качестве адъювантов.

**Цель исследования** – оценка антипролиферативного действия на моделях колоректального рака и рака почки человека новых миРНК как адъювантов для иммуно-/химиотерапии.

**Материалы и методы.** МиРНК/антиCD47 и двухкомпонентная миРНК антиМСМ4/антиLIVIN разработаны в Медико-генетическом научном центре им. акад. Н.П. Бочкова и изучены в виде липидной дисперсии для внутривенного введения. Доклинические модели – подкожные ксенографты рака толстой кишки РТК-8 и рака почки человека Рпоч1/CD47, мыши Balb/c nude – получены из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В адъювантном режиме миРНК/антиCD47 изучена в сочетании с активированными макрофагами человека (АМ), миРНК антиМСМ4/антиLIVIN (1:1) – с циклозависимым цитостатиком оксалиплатином (ОХР). Режимы введения обоснованы ранее. Показатели и критерии эффективности (treatment/control (T/C)  $\leq 42\%$ ), переносимость воздействий и статистический анализ при  $p < 0,05$  – стандартные для экспериментальной терапии рака. Лабораторные манипуляции регламентированы действующими рекомендациями Минздрава России.

**Результаты.** Схема миРНК/антиCD47 + АМ практически неэффективна на Рпоч-1/CD47, T/C = 45 % ( $p > 0,05$ ). Схема с миРНК антиМСМ4/антиLIVIN + 24 ч на РТК-8, малочувствительном к ОХР, показала значимый адъювантный эффект в сравнении с монокимиотерапией, T/C = 33–21 % против T/C<sub>min</sub> = 49 % ( $p \leq 0,05$ ). Обе схемы хорошо переносимы.

**Заключение.** Доклиническое изучение показало спорность предположения о возможности адъювантного применения миРНК/антиCD47 с АМ и перспективность миРНК антиМСМ4/антиLIVIN на малочувствительной к циклозависимому ОХР модели рака толстой кишки человека с возможностью синхронизации клеточного цикла.

**Ключевые слова:** миРНК, онкомишень, опухолевая модель, антипролиферативное действие, адъювантный режим

**Для цитирования:** Трещалина Е.М., Смирнова Г.Б., Кузеванова А.Ю. и др. Доклинические характеристики дуплексов миРНК в качестве таргетных адъювантов при злокачественном росте. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):41–7.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-41-47>

## Preclinical characteristics of siRNA duplexes as targeted adjuvants in malignant growth

Helen M. Treshalina<sup>1</sup>, Galina B. Smirnova<sup>1</sup>, Anna Yu. Kuzevanova<sup>2</sup>, Saida Sh. Karshieva<sup>1</sup>, Mikhail V. Kiselevskiy<sup>1</sup>,  
Alexander V. Karpukhin<sup>2</sup>, Mikhail A. Maslov<sup>3</sup>, Andrei A. Alimov<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>*Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;*

<sup>3</sup>*MIREA–Russian Technological University; 78 Vernadsky Prospekt, Moscow 119454, Russia*

**Contacts:** Helen Mikhailovna Treshalina [treshalina@yandex.ru](mailto:treshalina@yandex.ru)

**Background.** Small or short double-stranded interfering RNAs (siRNAs, small interfering RNAs) 20–25 nucleotides long are known to be able to target block uncontrolled malignant proliferation. As target genes, apoptosis inhibitors are considered, including the cellular glycoprotein CD47 (cluster of differentiation 47), and genes of the replicative complex that regulate the cell cycle in the S phase. This determines the relevance of the study in tumor models of siRNAs aimed at these targets as adjuvants.

**Aim.** To evaluate the antiproliferative effects of novel siRNAs as adjuvants for immune-/chemotherapy in human colorectal and renal cancer models.

**Materials and methods.** SiRNA/antiCD47 and two-component siRNA antiMSM4/antiLIVIN were developed at the Research Centre for Medical Genetics and studied in lipid dispersion for intravenous (IV) administration. Preclinical models – subcutaneous xenographs of RTK-8 colon cancer and human kidney cancer Rpoch-1/CD47, Balb/c nude mice were obtained from the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. In the adjuvant mode, siRNA/antiCD47 was studied in combination with activated human macrophages (AM), siRNA antiMSM4/antiLIVIN (1:1) – with cyclic-dependent cytostatic oxaliplatin (OXP). Administration regimens are justified earlier. Efficacy parameters and criteria (treatment/control (T/C)  $\leq 42\%$ ), tolerability of effects and statistical analysis at  $p < 0.05$  are standard for experimental cancer therapy. Laboratory manipulations are regulated by the current recommendations of the Ministry of Health of the Russia.

**Results.** The siRNA/anti-CD47 + AM regimen was practically ineffective at Rpoch-1/CD47, T/C = 45 % ( $p > 0.05$ ). The antiMCM4/antiLIVIN + 24 h siRNA regimen on an OXP-insensitive RTK-8 showed a significant adjuvant effect against cytostatic, T/C = 33–21 % versus T/C<sub>min</sub> = 49 % ( $p \leq 0.05$ ). Both combinations were tolerable.

**Conclusion.** Preclinical study showed the controversy of the assumption about the possibility of adjuvant use of siRNA/antiCD47 with AM and the promise of antiMSM4/antiLIVIN siRNA on low-sensitivity to cycle-dependent OXR in human colon cancer with the possibility of cell cycle synchronization.

**Keywords:** siRNAs, cancer marker, tumor model, antiproliferative action, adjuvant scheme

**For citation:** Treshalina H.M., Smirnova G.B., Kuzevanova A.Yu. et al. Preclinical characteristics of siRNA duplexes as targeted adjuvants in malignant growth. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):41–7. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-41-47>

## Введение

Исследования по созданию лекарственных препаратов на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) ведутся с момента открытия механизма РНК-интерференции (RNAi) в 1998 г. Механизм задействован в активации процесса деградации микроРНК (мРНК) в клетках эукариотов и является важным элементом посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [1]. В связи с этим выделяют 2 группы молекул, представляющих интерес с точки зрения таргетной терапии: мРНК и миРНК. В 1-ю группу включают независимо транскрибируемые единицы генома, гены которых расположены в определенных хромосомных локусах. Ко 2-й группе относят молекулы, которые образуются в результате биогенеза мРНК или поступают в клетки извне в результате эндоцитоза [2]. Вне зависимости от процесса обработки все миРНК до связывания с РНК-индуцируемым комплексом выключения генов (RNA-induced silencing complex, RICS) представляют собой дуплексы, образованные 2 короткими комплементарными молекулами РНК длиной 20–25 нуклеотидов. Показано, что миРНК, направленно ингибирующие экспрессию генов, регулирующих пролиферацию, могут рассматриваться в качестве потенциальных таргетных адьювантов для поддержания или усиления противоопухолевого действия при раке толстой кишки [3]. В качестве возможных таргетных препаратов также рассматриваются миРНК, способные подавить экспрессию генов-ингибиторов апоптоза при различных локализациях рака [4, 5]. Показано, что совместное ингибирование экспрессии генов *TGF-β1* и *COX-2* при помощи миРНК способствует подавлению роста клеток гепатоцеллюлярной карциномы, инфильтрации Т-клеток в опухоль и улучшению ответа на ингибиторы иммунных контрольных точек на мышиных моделях [6]. Для усиления фагоцитарной активности инфильтрованных в ткань опухоли фагоцитов предлагается блокировать при помощи миРНК экспрессию гена *CD47* в клетках опухоли, белковый продукт которого – клеточный гликопротеин CD (cluster of differentiation) 47, связываясь с рецептором сигнально-регуляторного белка α (SIRPα), подавляет фагоцитоз опухолевой клетки [7]. Подобные эффекты некоторых

зано, что миРНК, направленно ингибирующие экспрессию генов, регулирующих пролиферацию, могут рассматриваться в качестве потенциальных таргетных адьювантов для поддержания или усиления противоопухолевого действия при раке толстой кишки [3]. В качестве возможных таргетных препаратов также рассматриваются миРНК, способные подавить экспрессию генов-ингибиторов апоптоза при различных локализациях рака [4, 5]. Показано, что совместное ингибирование экспрессии генов *TGF-β1* и *COX-2* при помощи миРНК способствует подавлению роста клеток гепатоцеллюлярной карциномы, инфильтрации Т-клеток в опухоль и улучшению ответа на ингибиторы иммунных контрольных точек на мышиных моделях [6]. Для усиления фагоцитарной активности инфильтрованных в ткань опухоли фагоцитов предлагается блокировать при помощи миРНК экспрессию гена *CD47* в клетках опухоли, белковый продукт которого – клеточный гликопротеин CD (cluster of differentiation) 47, связываясь с рецептором сигнально-регуляторного белка α (SIRPα), подавляет фагоцитоз опухолевой клетки [7]. Подобные эффекты некоторых

миРНК описаны не только на клетках и модельных системах, но и при системном (внутривенном или подкожном) введении в клинику при терапии редких наследственных заболеваний — амилоидной полинейропатии и острой печеночной порфирии [2]. Среди отечественных соединений такого типа интересны полученные в лаборатории молекулярной генетики Медико-генетического научного центра комплексы, созданные на основе двухцепочечных миРНК длиной 21 нуклеотид. Новые агенты представляют собой липидную дисперсию РНК (рабочие шифры миРНК/антиCD47, миРНК антиMCM4/антиLIVIN) и вызывают интерес в онкологии в качестве адресных корректоров злокачественной цитопролиферации, например, при раке толстой кишки и раке почки. В статье приведен экспериментальный подход к изучению новых миРНК на моделях опухолей человека *in vivo* под контролем переносимости.

**Цель исследования** — оценка антипролиферативного действия на моделях колоректального рака и рака почки человека новых миРНК как адъювантов для иммуно-/химиотерапии.

## Материалы и методы

### Верификация клеточных мишеней для тестируемых миРНК

Использованы перевиваемые клеточные линии опухолей человека из биобанка НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина: светлоклеточный рак почки Рпоч1КК для миРНК/антиCD47 и колоректальный полипозный рак НТ-29 для миРНК антиMCM4/антиLIVIN. Обе линии культивировали в стандартных условиях. Эффективность РНК-интерференции оценивали по изменению относительного числа копий РНК в клетке методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве контролей использовали клетки без обработки, в случае миРНК/антиCD47 также обработанные липосомальным вектором, загруженным случайными (non-targeting) миРНК CON1 [8]. Суммарную фракцию РНК из клеток выделяли общепринятым способом с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Относительное определение уровня представленности транскрипта в образце проводили с использованием стандартного оборудования и программного обеспечения Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США), для внутреннего контроля — ген *GAPDH*. Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

### Объекты

Оба агента (далее — сочетания) — это липофильные субстанции на основе таргетных миРНК миРНК/антиCD47 и двухкомпонентной миРНК антиMCM4/антиLIVIN. Субстанции получали в лаборатории

**Таблица 1.** Последовательности праймеров генов-мишеней

**Table 1.** Primer sequences of target genes

миРНК siRNA	Ген Gen	Праймер Primer
АнтиCD47 AntiCD47	CD47-F	5'-AGAAGGTGAAA CGATCATCGAGC-3'
	CD47-R	5'-CTCATCCATA CCACCGGATCT-3'
АнтиMCM4 AntiMCM4	MCM4-F	5'-GACAAGATGA ATGAAAGTACAA-3'
	MCM4-R	5'-GTCCAGCAAG AGGAAGATCAA-3'
АнтиLIVIN AntiLIVIN	LIVIN-F	5'-AGACTCACT CCCAGCTGC-3'
	LIVIN-R	5'-TTGCACGTC CTCTCCTCC-3'
Контроль Control	GAPDH-F	5'-GGCTGCTTT TAACTCTGG-3'
	GAPDH-R	5'-GGAGGGAT CTCGCTCC-3'

молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова с использованием дисперсии катионных липосом. Субстанции представляли собой готовые стерильные растворы для инъекций с pH 6,8–7,4. Для введения мышам ранее установлена переносимость растворов под контролем отсутствия гибели от тромбоэмболии из-за возможной агрегации частиц. Инъекции выполняли в хвостовую вену мыши в индивидуальном режиме, все растворы вводили *ex tempore*.

МиРНК/антиCD47 содержит липидную дисперсию и двухцепочечные молекулы РНК длиной 21 нуклеотид, которые образуют наноструктурированные липоплексы (частицы) диаметром  $120 \pm 20$  нм [9]. Достаточная для подавления экспрессии таргетного гена в линии клеток Рпоч1 КК/CD47 концентрация миРНК/антиCD47, определенная предварительно через 48 ч после трансфекции, составляла от 25 до 50 нМ. Учитывая короткий период действия блокатора для применения АМ, рекомендован интервал 24 ч после курса миРНК.

Для внутривенного введения использован раствор 0,025 % концентрации (0,25 мг/мл по активному началу), разовая доза 3 мг/кг (75 мкг/мышь) в объеме 0,3 мл, необходимые сведения для анализа результатов. АМ получены из периферической крови здоровых доноров и активированы липополисахаридом (методика описана в разделе «Результаты»). Исходная концентрация готовой инъекционной суспензии АМ

в изотоническом растворе составляла  $2 \times 10^7$  кл/мл, рабочая концентрация —  $1 \times 10^6$  кл/мышь.

Сочетание миРНК/антиCD47 + 6 ч + АМ внутривенно вводили непосредственно после приготовления раствора мышам с подкожными ксенографтами рака почки Рпоч1/CD47 с помощью стерильных одноразовых пластиковых шприцов. Введение сочетания повторяли 3-кратно с интервалом 6 ч, разовая доза миРНК/антиCD47 составила 3 мг/кг в 0,3 мл, разовая доза АМ —  $1 \times 10^5$  кл/мышь в 0,1 мл. График введения: 4, 6 и 8-е сутки после имплантации опухоли.

АнтиMCM4/антиLIVIN — субстанция в виде суспензии в инъекционном растворе, концентрация 0,25 мг/мл (растворитель — стерильный физиологический раствор), содержание основного вещества в антиMCM4/антиLIVIN составляло 99 %. Введение мышам с РТК-8 выполняли внутривенно медленно (в течение 1 мин) в разовой дозе 5 мг/кг в режиме 3-кратного курса с интервалом 48 ч (суммарно 15 мг/кг). Сроки лечения — 5, 7 и 9-е сутки по отношению к имплантации опухоли.

Оксалиплатин (ОХР) — коммерческий препарат (Sanofi-Aventis France, Франция) во флаконе 20 мл (концентрация 5 мг/мл). В монорежиме ОХР вводили мышам с РТК-8 внутривенно однократно в эффективной дозе 12,5 мг/кг [10] после окончания введений миРНК (10-е сут опыта).

Сочетание антиMCM4/антиLIVIN + 24 ч + ОХР вводили последовательно в указанной схеме.

**Лабораторные животные.** Иммунодефицитные мыши (разведения и содержания НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [11]) отобраны под контролем стандартной динамики прироста массы тела путем взвешивания в день начала опыта на электронных весах MW-T series, User's Manual (CAS, США) с ценой деления 0,01 г. Отобранных мышей массой тела 20–22 г делили на группы по 6–8 особей, одну из групп без специфического лечения (мыши получали внутривенно физиологический раствор в соответствующем объеме и схеме введения) использовали для контроля роста опухоли (КРО).

**Опухолевые модели.** Подкожные ксенографты рака почки человека Рпоч1 (клеточная линия Рпоч1 КК) и рака толстой кишки человека РТК-8 (клеточная линия HT29) получены из Коллекции опухолевых штаммов человека НМИЦ [12]. Первая подкожная имплантация опухоли после криохранения выполнена 2 мышам-донорам по  $5 \times 10^6$  клеток в объеме 0,5 мл на мышь. Для опыта использованы донорские опухоли 2-го пассажа *in vivo*, достигшие пальпируемых размеров; 20 % опухолевую суспензию трансплантировали билатерально (в правый и левый бок) по 50 мг на мышь, соответственно в каждой группе по 12–16 опухолевых узлов. Особенности схем лечения даны при описании каждого из агентов. На-

личие экспрессии CD47 в клетках Рпоч1 КК подтверждено заранее.

**Оценка эффективности воздействия.** После окончания лечения у мышей всех групп трехкратно измеряли объемы опухолей и рассчитывали соотношение средних объемов опухолей Т/С (treatment/control) как стандартный показатель эффективности. Критерий эффективности — Т/С < 42 %, при Т/С = 100 % в группе КРО. В ряде случаев внутри каждой группы дополнительно оценивали в динамике скорость роста опухоли как соотношение средних объемов опухолевых узлов в последующий срок наблюдения по отношению к предыдущему  $[V_x/V_{x-1}]$  [13].

**Оценка переносимости воздействия.** В период проведения эксперимента контролировали качество жизни мышей (состояние/поведение), в также гибель от возможной токсичности, ожидаемой от непрогнозируемых для нового объекта причин.

**Статистическая обработка данных.** Величина Т-теста в сравниваемых группах, полученная при расчете критерия Фишера с помощью компьютерных программ Excel 2013 и Excel для Windows 2007, свидетельствовала о достоверности различий при  $p < 0,05$ .

**Завершение экспериментов.** После завершения исследования мышей умерщвляли декапитацией с соблюдением Принципов надлежащей лабораторной практики.

## Результаты и обсуждение

### Сочетание миРНК/антиCD47 + АМ

**Активация макрофагов человека.** Опухолевые клетки модифицировали методом липофекции миРНК для снижения уровня экспрессии рецептора CD47. Макрофаги выделяли из образцов лейкоцитарной взвеси здоровых доноров, полученной из отделения переливания крови НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и активировали по данной методике [14]. Изучение жизнеспособности и фенотипа макрофагов показало, что при окрашивании трипановым синим количество живых клеток составляет в среднем 98,2 %, а цитотоксическая активность АМ реализуется при соотношении «опухолевые клетки/макрофаги» 1:1. Методика приведена подробно из-за определенной ранее вариабельности жизнеспособности. АМ представляют собой клетки, характерные для моноцитов человека и одновременно экспрессирующие в  $44 \pm 2,8$  % случаев молекулы CD14 ( $45 \pm 5,2$  %), CD56 ( $10 \pm 9,4$  %), а также CD11c (доля  $46 \pm 7,5$  %).

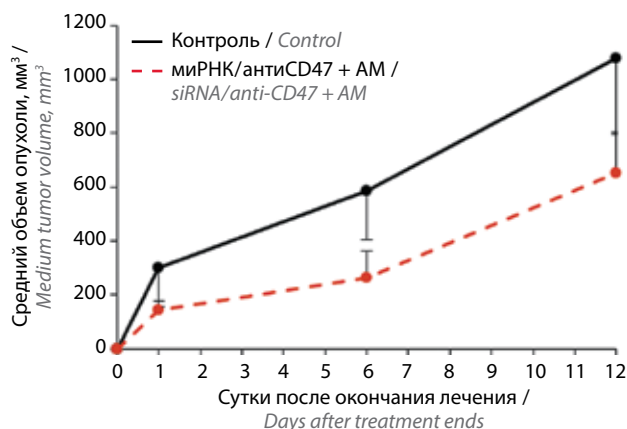
**Действие на рост опухоли.** Показано, что в группе КРО в процессе роста размеры опухоли варьируют от  $V_{cp} = 299 \pm 145$  до  $V_{cp} = 587 \pm 184$  мм<sup>3</sup>, Т/С = 100 %. Скорость роста опухоли к окончанию опыта составила  $[V_{III}/V_{II}] = 3,6$ , что свидетельствует о начале экспоненциальной фазы роста. В группе миРНК/антиCD47 + 6 ч + АМ слабый и незначимый эффект

получен только на 6-е сутки после окончания курса,  $T/C = 45\%$  против критерия  $T/C \leq 42\%$ . Динамика роста опухоли слабо положительная  $[V_{III}/V_{II}] = 2,1$  (рис. 1) и характерна для кратковременной стабилизации процесса. Кривые роста опухоли наглядно иллюстрируют динамику описанных процессов. Переносимость миРНК/антиCD47 + 6 ч + АМ в изученной схеме и дозах при 3-кратном внутривенном введении через 48 ч была удовлетворительной, без побочных эффектов.

### Сочетание миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP

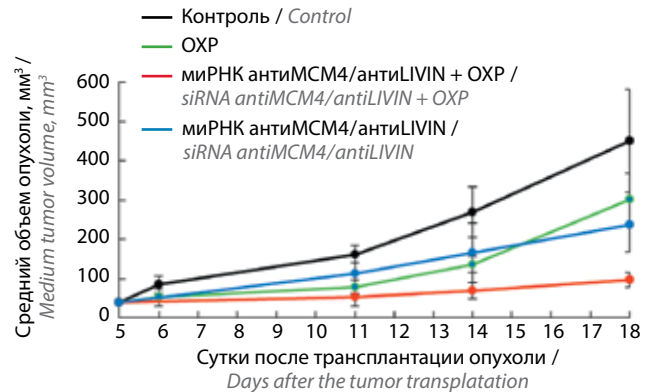
**Действие на рост опухоли.** В группе КРО подкожные ксенографты РТК-8 без лечения в течение 18 дней роста увеличились от  $V_{cp} = 84 \pm 21$  до  $V_{cp} = 451 \pm 131$  мм<sup>3</sup>. В группе миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP в течение 12 дней после окончания лечения получен значимый и достоверный противоопухолевый эффект на уровне  $T/C = 33, 26$  и  $21\%$  соответственно ( $p < 0,05$ ). Переносимость воздействия в изученных схемах и дозах при внутривенном введении была удовлетворительной, без побочных эффектов. В группах монотерапии на адекватные сроки эффект был слабым и находился ниже порогового уровня ( $T/C \leq 42\%$ ),  $T/C = 62/67$  и  $T/C = 69/53\%$  ( $p > 0,05$ ). Кривые роста опухолей адекватно иллюстрируют динамику описанных процессов (рис. 2, 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что сочетание миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP с предварительным длительным (на 5–9-й дни после трансплантации) введением дуплекса и последующим (через 1 сут) введением цитостатика оказалось эффективным. Положительная динамика торможения роста опухоли во времени после сочетанной терапии со значимым снижением  $T/C = 33\%$  до  $T/C = 21\%$



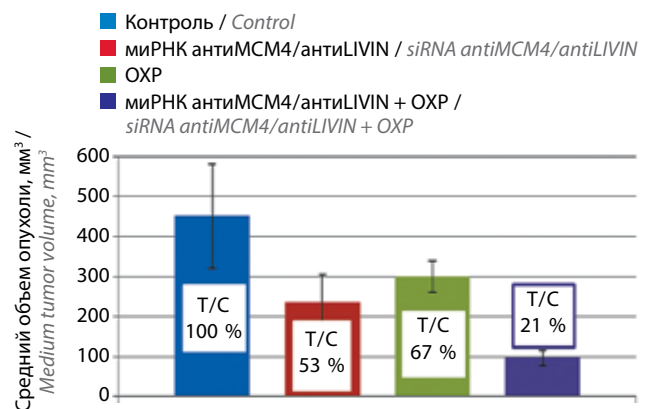
**Рис. 1.** Динамика роста подкожного ксенографта RpoC-1 под действием миРНК/антиCD47 + активированные макрофаги человека (АМ) в режиме 3-кратного внутривенного введения

Fig. 1. Dynamics of RpoC-1 subcutaneous xenograft growth under the action of siRNA/anti-CD47 + activated human macrophages (AM) in the mode of 3-fold intravenous administration



**Рис. 2.** Динамика роста подкожных ксенографтов рака толстой кишки человека РТК-8 у мышей-самцов Balb/c nude при адъювантной терапии миРНК антиMCM4/антиLIVIN + оксалиплатин (OXP)

Fig. 2. Growth dynamics of subcutaneous human colon cancer xenografts RTK-8 in male Balb/c nude mice with adjuvant therapy of antiMCM4/antiLIVIN + oxaliplatin (OXP) siRNA



**Рис. 3.** Сравнительная эффективность адъювантной терапии миРНК антиMCM4/антиLIVIN + оксалиплатин (OXP) на подкожных ксенографтах рака толстой кишки человека РТК-8 на 12-е сутки после лечения.  $T/C$  — treatment/control (лечение/контроль).

Fig. 3. Comparative efficacy of adjuvant therapy with antiMCM4/antiLIVIN + oxaliplatin (OXP) siRNA against subcutaneous human colon cancer xenografts RTK-8 on day 12 after treatment.  $T/C$  — treatment/control

(критерий  $T/C < 42\%$ ) привела к минимальному объему опухолевых узлов 400 мм<sup>3</sup> через 3 нед. В сравнении с применением компонентов сочетания в монорежиме, не оказавшем значимого ингибирующего действия в использованных режимах,  $T/C > 49\%$ . Это позволяет считать, что примененная в адъювантном режиме миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP при лечении малочувствительной к OXP опухолевой модели может существенно повысить противоопухолевый эффект цитостатика при его максимальной дозировке. С учетом направленности дуплекса на контроль клеточного цикла можно рассматривать реставрацию апоптоза выживших после цитостатика и находящихся в интерфазе клеток как возможный механизм адъювантного усиления ингибирующего действия [15].

## Заключение

Доклинические исследования на опухолях человека *in vivo* 2 ориентированных на определенные онкомишени парентеральных миРНК выявили некоторые характеристики их действия в адъювантном режиме для иммуно/химиотерапии. Отсутствие терапевтического выигрыша цитотоксичных АМ на модели рака почки человека Рпоч-1/CD47<sup>+</sup> при сочетании с направленной на реставрацию макрофагального звена миРНК/антиCD47 не дает основания для положительной оценки адъювантных свойств этого агента. Однако установленные переносимые дозовые и временные характеристики между компонентами открывают возможность поиска ожидаемо-

го эффекта путем оптимизации схемы сочетанного воздействия, возможно, при другой локализации процесса, например, при меланоме кожи. Направленная на «выключение» контролирующих целостность генома генов-ингибиторов композиция миРНК антиМСМ4/антиLIVIN показала способность двукратно усиливать ингибирующее действие алкилирующего цитостатика ОХР на малочувствительной модели рака толстой кишки РТК-8. Предположено, что адъювантный эффект возникает благодаря синхронизации клеток в S-фазе без выхода в митоз. Эта композиция может рассматриваться как потенциальный адъювант для специфической противоопухолевой химиотерапии циклозависимыми агентами.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Setten R.L., Rossi J.J., Han S.P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature reviews. Drug Discovery* 2019;18(6):421–46. DOI: 10.1038/s41573-019-0017-4
- Hu B., Zhong L., Weng Y. et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Sig Transduct Target Ther* 2020;5(1):101. DOI: 10.1038/s41392-020-0207-x
- Oh B.Y., Kim K.H., Chung S.S., Lee R.A. Silencing the livin gene enhances the cytotoxic effects of anticancer drugs on colon cancer cells. *Ann Surg Treat Res* 2016;91(6):273–7. DOI: 10.4174/astr.2016.91.6.273
- Choi M.J., Kang S.J., Lee Y.K. et al. Novel lipid nanocomplex co-carrying Bcl2 siRNA and quantum dots for EGF receptor-targeted anti-cancer theranosis. *Int J Mol Sci* 2024;25(11):6246. DOI: 10.3390/ijms25116246
- Li Y., Zou J., Zhang Q. et al. Systemic analysis of the DNA replication regulator MCM complex in ovarian cancer and its prognostic value. *Front Oncol* 2021;11(68):1261–8. DOI: 10.3389/fonc.2021.681261
- Kim W., Ye Z., Simonenko V. et al. Codelivery of TGFβ and Cox2 siRNA inhibits HCC by promoting T-cell penetration into the tumor and improves response to Immune Checkpoint Inhibitors. *NAR Cancer* 2024;6(1):zcad059. DOI: 10.1093/narcan/zcad059
- Lee J.W., Yoon H.Y., Ko Y.J. et al. Dual-action protein-siRNA conjugates for targeted disruption of CD47-signal regulatory protein α axis in cancer therapy. *ACS nano* 2024;18(33):22298–315. DOI: 10.1021/acsnano.4c06471
- Bartlett D.W., Davis M.E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 2006;34(1):322–33. DOI: 10.1093/nar/gkj439
- Luneva A.S., Puchkov P.A., Shmendel E.V. et al. Optimization of the technology for the preparation of cationic liposomes for the delivery of nucleic acids. *Russ J Bioorg Chem* 2018;44(6):724–31. DOI: 10.1134/S1068162019010084
- Soriano P.A., Liu N., Castillo E. et al. Oxaliplatin but not irinotecan impairs posthepatectomy liver regeneration in a murine model. *Int J Hepatol* 2011;2011:490463. DOI: 10.4061/2011/490463
- Трешалина Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):6–12. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13  
Treshalina H.M. Immunodeficient Balb/c nude mice and modeling of different tumor growth variants for preclinical studies. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):6–12. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13
- Трешалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. М.: Практическая медицина, 2009. 171 с.  
Treshalina H.M. Collection of human tumor strains. Moscow: Practical Medicine, 2009. 171 p. (In Russ.).
- Трешалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. С. 642–657.  
Treshalina H.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidelines for preclinical study of antitumor activity of drugs. In: *Guidelines for preclinical studies of drugs*. Moscow: Grif i K, 2012. Part 1. P. 642–657. (In Russ.).
- Lewis B.M., Patial S., Saini Y. *In vitro* screening method for characterization of macrophage activation responses. *Methods Protoc* 2022;5(5):68. DOI: 10.3390/mps5050068
- Карпухин А.В., Алимов А.А., Маслов М.А., Кузеванова А.Ю. Композиция для ингибирования роста и стимуляции апоптоза клеток колоректального рака. Патент RU 2 644 675(13) C1. 2018.  
Karpukhin A.V., Alimov A.A., Maslov M.A., Kuzevanova A.Yu. Composition for inhibition of growth and stimulation of apoptosis of colorectal cancer cells. Patent RU 2 644 675 (13) C1. 2018. (In Russ.).

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотруднику лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» М.А. Маслову за любезно предоставленную для исследований субстанцию.

**Acknowledgements.** The authors express their gratitude to M.A. Maslov, a member of the Laboratory of Molecular Genetics of Complexly Inherited Diseases, Research Centre for Medical Genetics for kindly providing the substance for research.

#### **Вклад авторов**

Е.М. Трещалина: разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных литературы и экспериментальных данных, написание и редактирование рукописи;

Г.Б. Смирнова: подготовка и выполнение экспериментов на животных, получение и статистическая обработка данных, составление иллюстраций;

А.Ю. Кузеванова: проведение экспериментов на культурах злокачественных клеток, получение и обработка данных, статистическая обработка результатов, составление иллюстраций;

С.Ш. Каршиева: подготовка экспериментов на культурах злокачественных клеток, анализ и составление иллюстраций;

М.В. Киселевский: разработка концепции исследования, подготовка и проведение экспериментов на культуре активированных макрофагов человека;

А.В. Карпухин: разработка концепции исследования, подготовка данных литературы и руководство работой по подготовке агента для экспериментальных исследований с моделью колоректального рака человека, анализ полученных данных;

М.А. Маслов: разработка концепции исследования, подготовка данных литературы, получение липосом;

А.А. Алимов: разработка концепции исследования, подготовка данных литературы и подготовка агентов для экспериментальных исследований с моделями злокачественного роста, анализ полученных данных.

#### **Author's contributions**

H.M. Treshalina: development of research concept and design, literature collection and analysis article data preparation, drafting and editing the manuscript;

G.B. Smirnova: preparation and execution of experiments on animals, obtaining and statistical processing of data, drawing up illustrations;

A.Yu. Kuzevanova: conducting experiments on cultures of malignant cells, obtaining and processing data, statistical processing of results, drawing up illustrations;

S.Sh. Karshieva: preparation of experiments on cultures of malignant cells, analysis and drawing up illustrations;

M.V. Kiselevskiy: development of research concept, preparation and conduct of experiments on culture of activated human macrophages;

A.V. Karpukhin: development of research concept, preparation of literature data and guidance on the preparation of an agent for experimental studies with a human colorectal cancer model, analysis of the data obtained;

M.A. Maslov: development of research concept, preparation of literature data, liposome preparation;

A.A. Alimov: development of research concept, preparation of literature data and preparation of agents for experimental studies with malignant growth models, analysis of the data obtained.

#### **ORCID авторов / ORCID of authors**

Е.М. Трещалина / H.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>

Г.Б. Смирнова / G.B. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0002-4599-7284>

А.Ю. Кузеванова / A.Yu. Kuzevanova: <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>

С.Ш. Каршиева / S.Sh. Karshieva: <https://orcid.org/0000-0003-2469-2315>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

А.В. Карпухин / A.V. Karpukhin: <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

М.А. Маслов / M.A. Maslov: <https://orcid.org/0000-0002-5372-1325>

А.А. Алимов / A.A. Alimov: <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».

**Funding.** The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia for the Research Centre for Medical Genetics.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (протокол № 1 от 04.04.2023).

**Conformity of the principles of bioethics.** The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes. The Committee on Bioethics of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology approved the protocol of the study (Protocol No. 1 dated 04.04.2023).

Статья поступила: 21.03.2025. Принята в печать: 13.05.2025. Опубликовано онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 21.03.2025. Accepted for publication: 13.05.2025. Published online: 27.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-48-55>

# Оценка нейротоксичности антрафурана – нового противоопухолевого препарата из класса антрацендионов

В.А. Полозкова<sup>1</sup>, М.И. Трещалин<sup>1</sup>, С.Г. Язерян<sup>1</sup>, А.Е. Шчекотихин<sup>1,2</sup>, Э.Р. Переверзева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»; Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»; Россия, 125047 Москва, Миусская пл., 9

**Контакты:** Василиса Антоновна Полозкова [vasilisa2006@gmail.com](mailto:vasilisa2006@gmail.com)

**Введение.** Нейротоксичность – один из побочных эффектов антибиотиков антрациклинового ряда, выявленных при клиническом использовании. Хотя этот вид токсичности не является лимитирующим, он существенно влияет на качество жизни больных. Сходное с антрациклинами по структуре соединение антрафуран получено путем химического синтеза в Научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе. Оно проявило высокую активность в экспериментах на моделях перевиваемых опухолей мышей при пероральном введении. Соединение проникает через гематоэнцефалический барьер, поэтому ранее было проведено исследование его нейротоксичности в максимально переносимой дозе.

**Цель исследования** – экспериментальная оценка нейротоксичности антрафурана при пероральном применении в терапевтической дозе и при трехкратном ее превышении.

**Материалы и методы.** В эксперименте использованы самки беспородных крыс. Животных содержали в условиях, соответствующих ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Субстанцию антрафурана вводили однократно перорально в виде 1,2 % раствора в 5 % растворе глюкозы для инъекций в дозах 20 и 60 мг/кг. Двигательную и исследовательскую активность животных оценивали в установке «Открытое поле» через 4 ч, 1 сут и 1 мес после введения. Для выявления когнитивной дисфункции на 3–5-е сутки после введения препарата крыс обучали пищедобывательному навыку в Т-образном лабиринте.

**Результаты.** Введение препарата в терапевтической дозе (20 мг/кг) не вызвало отклонений в поведении животных в установке «Открытое поле» и не отражалось на способности к обучению в Т-образном лабиринте. В дозе, трехкратно превышающей терапевтическую (60 мг/кг), антрафуран снижал исследовательскую активность крыс в установке «Открытое поле» через 4 и 24 ч после введения и вызывал угнетение способности к обучению пищедобывательному навыку.

**Заключение.** Применение антрафурана в терапевтической дозе не вызывает выраженных нейротоксических реакций. Для дальнейшего продвижения препарата необходимо углубленное изучение влияния его субстанции и лекарственной формы на поведенческие реакции и когнитивные способности крыс.

**Ключевые слова:** антрафуран, «Открытое поле», Т-образный лабиринт, когнитивная дисфункция, крыса

**Для цитирования:** Полозкова В.А., Трещалин М.И., Язерян С.Г. и др. Оценка нейротоксичности антрафурана – нового противоопухолевого препарата из класса антрацендионов. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):48–55.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-48-55>

## Evaluation of neurotoxicity of anthrafuran, a new antitumor drug from the anthracenediones class

Vasilisa A. Polozkova<sup>1</sup>, Michael I. Treshchalin<sup>1</sup>, Sofiya G. Yazeryan<sup>1</sup>, Andrey E. Shchekotikhin<sup>1,2</sup>, Eleonora R. Pereverzeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gause Institute of New Antibiotics; 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., 119021 Moscow, Russia;

<sup>2</sup>D.I. Mendeleev University of Chemical Technology; 9 Miusskaya pl., Moscow 125047, Russia

**Contacts:** Vasilisa Antonovna Polozkova [vasilisa2006@gmail.com](mailto:vasilisa2006@gmail.com)

**Background.** Neurotoxicity is a side effect of anthracycline antibiotics that has been identified during clinical use. While this type of toxicity may not be limiting, it can significantly affect the quality of life for patients. In the Gause Institute of New Antibiotics an antitumor compound called anthrafuran has developed, that is similar in structure to anthracyclines. This compound has shown high activity in experiments using mouse models of transplanted tumors when administered orally. Anthrafuran has the ability to penetrate the blood-brain barrier, so a study of its neurotoxicity was previously conducted at the maximum tolerated dose.

**Aim.** To experimentally evaluate the neurotoxicity of anthrafuran when it is administered orally at both a therapeutic dose and three times the therapeutic dose.

**Materials and methods.** Female Albino rats were used in the experiment. The animals were kept under conditions accordance to GOST 33044–2014 “Principles of good laboratory practice”. Anthrafuran substance was administered orally as a 1,2 % solution in 5 % glucose for injection at doses of 20 and 60 mg/kg once. Motor and research activity of the animals was evaluated in an Open Field test setting 4 hours, one day, and one month after administration. To detect cognitive dysfunction, rats were trained in a T-maze with food reward 3–5 days after drug administration.

**Results.** Administration of the drug at a therapeutic dose of 20 mg/kg did not cause any abnormal behavior in animals in the Open Field or affect the ability to learn in the T-maze. However, at a dose three times higher than the therapeutic dose (60 mg/kg), anthrafuran decreased the research activity of rats in the Open Field 4 and 24 hours after administration and inhibited the ability to acquire learning in T-maze.

**Conclusion.** The use of anthrafuran in a therapeutic dose did not cause pronounced neurotoxic reactions. In order to further promote the drug, it is necessary to conduct an in-depth study on the effect of the substance and dosage forms on the behavioral responses and cognitive abilities of rats.

**Keywords:** anthrafuran, Open Field, T-maze, cognitive dysfunction, rat

**For citation:** Polozkova V.A., Treshchalin M.I., Yazeryan S.G. et al. Evaluation of neurotoxicity of anthrafuran, a new antitumor drug from the anthracenediones class. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):48–55. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-48-55>

## Введение

Антрациклиновые антибиотики (доксорубин, даунорубин, эпирубин, идарубин, митоксантрон и др.) — высокоактивные противоопухолевые препараты, широко применяемые в клинической практике [1]. Побочным действием, лимитирующим их использование, является кардиотоксичность. В то же время для препаратов данной группы характерны нейротоксические реакции, которые активно исследуются в последние годы [2].

В настоящее время накопилось большое количество клинических наблюдений, доказывающих, что противоопухолевая химиотерапия оказывает негативное влияние на нервную систему. Это выражается в ухудшении когнитивных функций, в том числе памяти, внимания, обучаемости, что негативно сказывается на качестве жизни больных. Такие явления могут проявляться отсроченно у пациентов, находящихся в состоянии ремиссии [3]. Особенно большое количество данных связано с лекарственным лечением рака молочной железы. Поскольку в клинике используется комбинированная терапия, нередко сложно определить, какой именно препарат вызвал когнитивную дисфункцию. Именно поэтому изучение данного явления и его механизмов в последние годы активно ведется на лабораторных животных [4].

Выраженный эффект когнитивной дисфункции характерен после применения доксорубина. Для данного препарата собран наибольший процент

клинических наблюдений за пациентами после химиотерапии. Особенно сильное влияние доксорубина оказывает на женщин [4].

В экспериментах на животных также наибольший массив полученных данных связан с применением доксорубина. Хотя данный препарат не проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), он оказывает опосредованное влияние на центральную нервную систему. Механизмы такого влияния чаще всего связывают с оксидативным стрессом, повышением уровня цитокинов и опосредованно вызванным нейровоспалением [3–5]. В морфологических исследованиях наиболее часто изучаемой структурой является гиппокамп, поскольку он напрямую связан с когнитивными функциями, а также участвует в нейрогенезе [5].

Схожим по структуре с доксорубином является митоксантрон, ингибитор топоизомеразы II. В отличие от доксорубина его нейротоксичность слабо изучена. Однако существуют и клинические, и экспериментальные данные, подтверждающие, что митоксантрон также вызывает эффект когнитивной дисфункции [6].

На базе антрахинона, входящего в формулу антрациклиновых антибиотиков, в том числе доксорубина, в лаборатории химической трансформации антибиотиков Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков (НИИНА) им. Г.Ф. Гаузе разработано и синтезировано новое

вещество — антрафуран (АФ), проявившее высокую противоопухолевую активность, в том числе при пероральном применении. Данное вещество по механизму действия является мультитаргетным ингибитором топоизомераз I и II [7–10]. Механизм действия АФ имеет сходство с таковым у митоксантрона. Фармакокинетические (неопубликованные данные) и токсикологические [11] данные свидетельствуют о том, что, в отличие от структурных предшественников, АФ проникает через ГЭБ. Этот факт послужил основанием для проведения пилотного эксперимента по оценке влияния однократного введения субстанции АФ в максимально переносимой дозе (160 мг/кг) на двигательную и исследовательскую активность крыс в установке «Открытое поле». Обнаружено, что спустя 4 ч после введения — в момент максимального накопления АФ в головном мозге — у крыс достоверно снижались показатели двигательной (пройденное расстояние, средняя скорость) и исследовательской (количество контактов с норками, стоек, эпизодов груминга) активности в установке «Открытое поле» по сравнению с контролем. Через 24 ч после введения у крыс той же группы данные показатели возрастали, что свидетельствовало об обратимости эффекта [12]. Вместе с тем исследование нейротоксичности АФ при применении в терапевтических дозах (ТД) еще не проводили.

**Цель** настоящего исследования — оценка влияния АФ при применении в ТД на двигательную и исследовательскую активность крыс в установке «Открытое поле» и на их способность к обучению пищедобывательному навыку в Т-образном лабиринте.

### Материалы и методы

Исследование выполнено в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [13], согласно действующим в Российской Федерации Правилам лабораторной практики<sup>1</sup>, а также согласно Межгосударственному стандарту (ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»<sup>2</sup>). Работа соответствует этическим нормам обращения с животными, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [14]. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом НИИНА им. Г.Ф. Гаузе (протокол № 1 от 22.01.2024).

В работе использованы беспородные крысы-самки массой тела 180–200 г. После 2-недельного каран-

тина животные разделены на 3 группы по 10 голов в каждой. Субстанцию АФ вводили в дозах 20 мг/кг (соответствует 1 ТД для крыс) и 60 мг/кг (3 ТД). ТД для крыс получали путем пересчета с соответствующей дозы для мышей через коэффициент поверхности тела [15]. АФ растворяли в 5 % растворе глюкозы для инъекций, медленно нагревали на ультразвуковой бане («Сапфир», Россия) при температуре 50 °С в течение 5 мин и в виде 1,2 % раствора однократно вводили в желудок при помощи шприца со специальным металлическим зондом. Приготовление раствора осуществляли непосредственно перед введением. Контрольным животным вводили 5 % раствор глюкозы для инъекций в объеме 0,5 мл на 200 г массы тела. На протяжении эксперимента следили за состоянием и поведением животных.

Тестирование в установке «Открытое поле» (НПК «Открытая наука») [16, 17] осуществляли при помощи программы EthoVision 8.5 (Noldus Information Technology). Круглая установка (диаметр — 96 см, высота стен — 41 см) изготовлена из серого поливинилхлорида и имела 13 отверстий-«норок» диаметром 2 см. Тестирование проводили через 4 ч, 1 и 30 сут после введения препарата либо растворителя. Длительность тестирования составляла 5 мин. За час до начала опыта крыс приносили в экспериментальную комнату для привыкания к обстановке. В автоматическом режиме регистрировали следующие параметры: пройденное расстояние (см), среднюю скорость (см/с), двигательную активность в центральной и периферической зонах. В полуавтоматическом режиме фиксировали количество эпизодов груминга, вертикальных стоек, контактов с отверстиями-«норками».

Обучение в Т-образном лабиринте (НПК «Открытая наука», Россия) проводили по стандартной методике [18, 19]. Лабиринт изготовлен из серого АБС-пластика. Длина центрального рукава — 50 см, боковых — 55 см, высота стенок — 32 см. Используемый в эксперименте лабиринт дополнительно имел 2 полукруглых рукава, соединяющих концы боковых рукавов со стартовым отсеком. Это позволяло бесконтактно перемещать крысу на стартовую и, таким образом, избегать дополнительного стресса для животного. За 1 сут до начала эксперимента проводили приучение крыс к установке и пищевому подкреплению (очищенные необжаренные семена подсолнечника) в течение 15 мин. После этого у крыс забирали корм. Животных обучали в течение 3 дней, по 10 попыток в день. Длительность одной попытки составляла 2 мин. Если в течение 2 мин крыса находила

<sup>1</sup>Правила надлежащей лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71366108/?ysclid=mb1mypo0en240645800>.

<sup>2</sup>Принципы надлежащей лабораторной практики: ГОСТ 33044–2014. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115791?ysclid=mb84c2y8bm998249421>.

пищевое подкрепление, фиксировали правильное решение и продолжительность латентного периода. При пробежке крысы к пустой кормушке фиксировали неправильное решение и латентный период. По истечении 2 мин, если животное не подошло ни к одной кормушке, крысу направляли на стартовую позицию для следующей попытки.

Индекс рабочей памяти рассчитывали как процентное отношение числа правильных решений к общему числу попыток [20]. Анализировали также динамику изменения латентного периода правильных решений [21].

Для всех данных подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка. Для определения достоверности межгрупповых различий данные проанализированы с применением t-теста Стьюдента. Статистический анализ проведен посредством программы Microsoft Excel 2010. Различия определялись как достоверные при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

### «Открытое поле»

При анализе показателей двигательной активности крыс при первом тестировании в установке «Открытое поле» достоверных различий не выявлено, несмотря на уменьшение пройденного расстояния и средней скорости у животных, получавших АФ в дозе 60 мг/кг, по сравнению с контролем (рис. 1). Спустя 1 сут и 1 мес после введения препарата двигательная активность в установке «Открытое поле» снижалась у крыс всех групп, что свидетельствует о запоминании ими экспериментальной установки.

При 3-кратном превышении ТД спустя 4 ч после введения АФ происходило достоверное ослабление исследовательской активности крыс по сравнению с контролем, о чем свидетельствовало количество эпизодов груминга, стоек (рис. 2) и контактов с отверстиями-«норками» (недостоверно). Введение АФ в ТД не вызывало достоверных изменений в исследуемой активности крыс в установке «Открытое поле».

довательской активности крыс в установке «Открытое поле». Через 24 ч после введения субстанции препарата в высокой дозе об ослаблении исследовательской активности можно было судить по достоверному уменьшению числа контактов с норками и эпизодов груминга по сравнению с контролем. Спустя месяц отличия от контроля по данным параметрам отсутствовали.

Таким образом, введение АФ в дозе, трехкратно превышающей терапевтическую, вызывало снижение исследовательской активности крыс в установке «Открытое поле».

Применение АФ в дозе 20 мг/кг не оказывает влияния на двигательную и исследовательскую активность крыс в установке «Открытое поле». Трехкратное превышение ТД препарата вызывает достоверное снижение исследовательской, но не двигательной активности животных.

### Т-образный лабиринт

Т-образный лабиринт является универсальным и легко реализуемым тестом для оценки влияния различных препаратов на память и способность к обучению.

Индекс рабочей памяти крыс, получавших АФ в дозе 60 мг/кг, был достоверно ниже по сравнению с контролем (рис. 3). При дозе АФ 20 мг/кг достоверных отличий от контроля не выявлено.

Латентный период правильных решений был выше у группы, получавшей высокую дозу препарата (рис. 4). Стоит отметить, что данный показатель изменялся неравномерно.

Таким образом, крысы, получившие АФ в ТД, решают задачу пищедобывательного навыка в Т-образном лабиринте, как и контрольные животные. В то же время при 3-кратном превышении ТД крысы перестают решать задачу, из чего следует, что в высоких дозах препарат влияет на способность крыс к обучению.

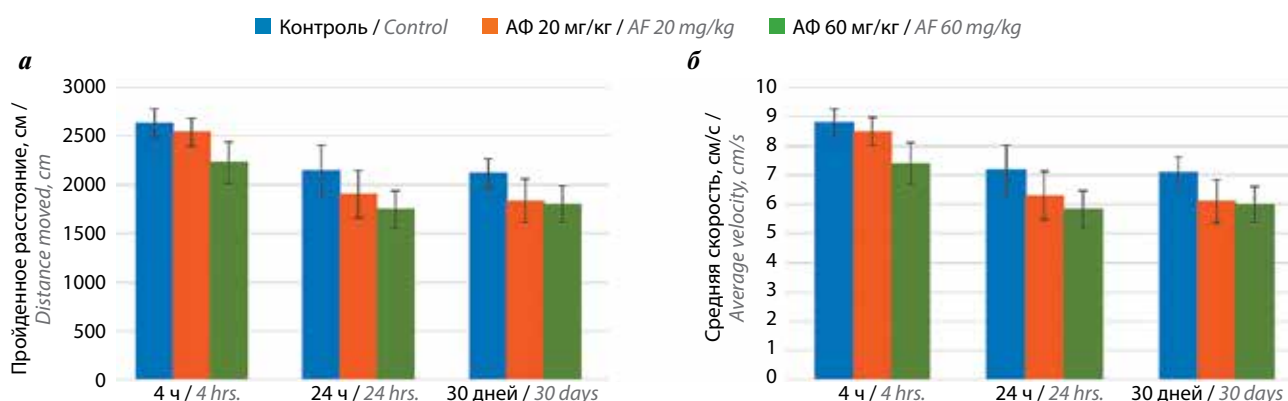
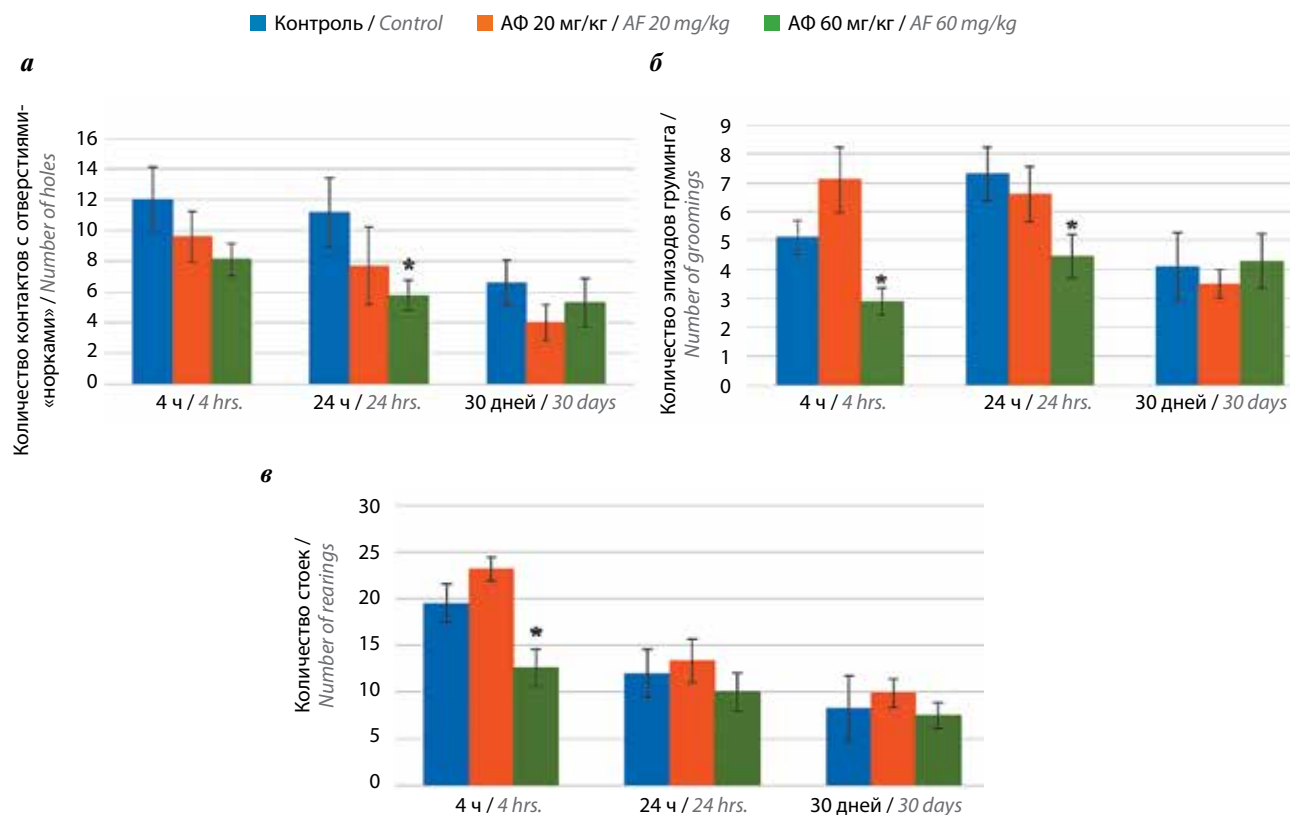


Рис. 1. Двигательная активность крыс в установке «Открытое поле» после введения антрафурана (АФ): а — пройденное расстояние; б — средняя скорость

Fig. 1. Motor activity of rats in the Open Field test after anthrafuran (AF) administration: a — distance moved; б — average velocity



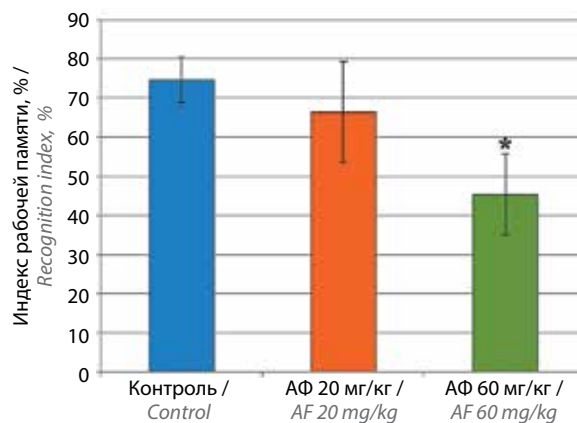
**Рис. 2.** Исследовательская активность крыс в установке «Открытое поле» после введения антрафурана (АФ): а — количество контактов с отверстиями-«норками»; б — количество эпизодов груминга; в — количество стоек; \* $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем

**Fig. 2.** Research activity of rats in the Open Field test after anthrafuran (AF) administration: а — number of holes; б — number of groomings; в — number of rearing; \* $p \leq 0,05$  compared to control

## Обсуждение

Изменение активности крыс в установке «Открытое поле» происходит после введения различных противоопухолевых препаратов. Данный параметр может изменяться в зависимости от дозы и режима применения лекарств. Так, по данным С. V. Cardoso и соавт., внутрибрюшинное введение доксорубина в еженедельной дозе 2,5 мг/кг в течение 4 нед не вызывает различий в параметрах на установке «Открытое поле» у крыс [22]. Вместе с тем в работе N. Okudan и соавт. показано, что внутрибрюшинное введение доксорубина в течение 2 нед в еженедельной дозе 4 мг/кг приводит к достоверному снижению двигательной активности животных в установке «Открытое поле» [23]. В целом исследователи расходятся во мнении по поводу влияния доксорубина на параметры теста «Открытое поле» у крыс [5].

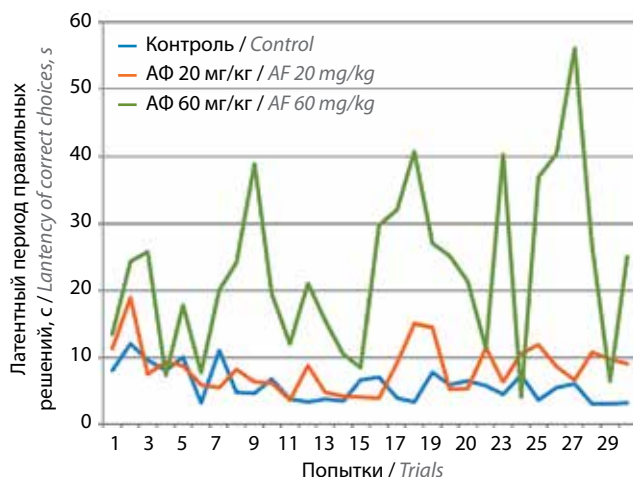
Что касается АФ, по данным, полученным нами ранее, однократного введения субстанции АФ в максимально переносимой дозе 160 мг/кг достаточно для снижения двигательной и исследовательской активности крыс в установке «Открытое поле», что регистрируется уже спустя 4 ч [12]. В данном исследовании 3-кратное превышение ТД АФ вызывало



**Рис. 3.** Индекс рабочей памяти (%) крыс в Т-образном лабиринте после введения антрафурана (АФ); \* $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем

**Fig. 3.** Recognition index of rats in the T-maze (%) after anthrafuran (AF) administration; \* $p \leq 0,05$  compared to control

достоверное снижение исследовательской активности крыс в установке «Открытое поле» по количеству стоек и эпизодов груминга. Изучение механизмов вертикальной активности крыс в установке «Открытое поле» показало, что стойки напрямую связаны со снижением активности Na/K-АТФазы в гиппокампе [24].



**Рис. 4.** Латентный период правильных решений в Т-образном лабиринте у крыс, получавших антрафуран (АФ)

**Fig. 4.** Latency of correct choices of rats in T-maze after anthrafuran (AF) administration

Другими авторами было обнаружено, что после введения противоопухолевых препаратов активность данного фермента в тканях мозга снижается [25]. Можно предположить, что проявление нейротоксических свойств АФ, которое выражается в достоверном снижении количества стоек в группе животных, получавшей препарат в дозе 60 мг/кг, также связано с воздействием на гиппокамп. Это в нашем эксперименте подтверждается проявлением признаков когнитивной дисфункции в виде снижения обучаемости в Т-образном лабиринте.

Поскольку достоверных различий по двигательной активности в установке «Открытое поле» не обнаружено, потеря способности к обучению в Т-образном лабиринте связана, по всей видимости, с непониманием животными задачи после введения препарата, т. е. непосредственно с когнитивными на-

выками. Повреждающее действие на обучаемость, а также кратко- и долговременную память является характерным наблюдением в экспериментах на животных после введения 5-фторурацила, метотрексата, цисплатина [4, 26]. При однократном внутривенном введении доксорубина в дозе 8 мг/кг (эквивалентной ТД для человека, пересчитанной на крыс) у крыс нарушались способности к обучению и повреждалась память [27].

Ряд исследователей предполагают, что механизмы когнитивной дисфункции при применении антрациклинов имеют общую почву с механизмами кардиотоксичности данных препаратов [28]. Нейротоксичность при применении и доксорубина, и митоксантрона носит опосредованный характер вследствие их неспособности проникать через ГЭБ. При этом АФ проникает через ГЭБ, не вызывая повреждения мозга при применении в ТД [11]. По-видимому, механизмы влияния АФ на центральную нервную систему отличаются от других препаратов антрациклинового ряда и требуют дальнейшего изучения.

### Заключение

Введение субстанции АФ в дозе 60 мг/кг, соответствующей ЗТД, снижает исследовательскую активность крыс в установке «Открытое поле» и угнетает их способность к обучению навыку нахождения пищи в Т-образном лабиринте. В то же время введение субстанции в дозе 20 мг/кг подобных эффектов не оказывает.

Таким образом, несмотря на способность АФ проникать через ГЭБ, при применении в терапевтической дозе он не вызывает тяжелых нейротоксических эффектов. Это делает возможными дальнейшие исследования субстанции АФ и указывает на перспективность изучения его лекарственной формы.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mattioli R., Ilari A., Colotti B. et al. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med* 2023;93:101205. DOI: 10.1016/j.mam.2023.101205
- Was H., Borkowska A., Bagues A. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced neurotoxicity. *Front Pharmacol* 2022;13:750507. DOI: 10.3389/fphar.2022.750507
- Pellacani C., Eleftheriou G. Neurotoxicity of antineoplastic drugs: Mechanisms, susceptibility, and neuroprotective strategies. *Adv Med Sci* 2020;65(2):265–85. DOI: 10.1016/j.advms.2020.04.001
- Dias-Carvalho A., Ferreira M., Ferreira R. et al. Four decades of chemotherapy-induced cognitive dysfunction: comprehensive review of clinical, animal and in vitro studies, and insights of key initiating events. *Arch Toxicol* 2022;96(1):11–78. DOI: 10.1007/s00204-021-03171-4
- El-Agamy S.E., Abdel-Aziz A.K., Esmat A., Azab S.S. Chemotherapy and cognition: comprehensive review on doxorubicin-induced chemobrain. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019;84(1):1–14. DOI: 10.1007/s00280-019-03827-0
- Dias-Carvalho A., Ferreira M., Reis-Mendes A. et al. Chemobrain: mitoxantrone-induced oxidative stress, apoptotic and autophagic neuronal death in adult CD-1 mice. *Arch Toxicol* 2022;96(6):1767–82. DOI: 10.1007/s00204-022-03261-x
- Shchekotikhin A.E., Luzikov Y.N., Preobrazhenskaya M.N. et al. 3-aminomethyl derivatives of 4,11-dihydroxynaphtho[2,3-f]-indole-5,10-dione for circumvention of anticancer drug resistance. *Bioorg Med Chem* 2005;13(6):2285–91. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.12.044
- Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhneva L.G. et al. Synthesis and evaluation of new antitumor

- 3-aminomethyl-4,11-dihydroxynaphtho[2,3-f]indole-5,10-diones. *Eur J Med Chem* 2014;86:797–805. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.021
9. Shchekotikhin A.E., Dezhenkova L.G., Tsvetkov V.B. et al. Discovery of antitumor anthra[2,3-b]furan-3-carboxamides: Optimization of synthesis and evaluation of antitumor properties. *Eur J Med Chem* 2016;112:114–29. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.050
  10. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N. et al. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafurane/Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation. *Eur J Pharm Sci* 2017;109:631–7. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.025
  11. Трещалин М.И., Трещалин И.Д., Голибродо В.А. и др. Экспериментальная оценка токсических свойств ЛХТА-2034 при пероральном применении. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(3):81–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-81-88
  - Treshalina M.I., Treschalin I.D., Golibrodo V.A. et al. Experimental evaluation of toxic properties of LHTA-2034 by the oral route of administration. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(3):81–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-81-88
  12. Голибродо В.А., Трещалин И.Д., Щекотихин А.Е., Переверзева Э.Р. Нейротоксические свойства противоопухолевого препарата антрафурана. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(1):75–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-75-79
  - Golibrodo V.A., Treschalin I.D., Shchekotikhin A.E., Pereverzeva E.R. Neurotoxic properties of new antitumor agent anthrafurane. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(1):75–9 (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-75-79
  13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М., 2012. Guidelines for Preclinical Studies of Drugs. Ed. by A.N. Mironov. Moscow, 2012. (In Russ.).
  14. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
  15. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44.
  16. Moser V.C. Functional assays for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol* 2011;39(1):36–45. DOI: 10.1177/0192623310385255
  17. Harry G.J., McBride S., Witchev S.K. et al. Roadbumps at the Crossroads of Integrating Behavioral and In Vitro Approaches for Neurotoxicity Assessment. *Front Toxicol* 2022;4:812863. DOI: 10.3389/ftox.2022.812863
  18. Deacon R.M.J., Rawlins J.N.P. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* 2006;1(1):7–12. DOI: 10.1038/nprot.2006.2
  19. Deacon R.M.J. Appetitive position discrimination in the T-maze. *Nat Protoc* 2006;1(1):13–5. DOI: 10.1038/nprot.2006.3
  20. Zlatanova H.I., Georgieva-Kotetanova M.T., Vilmosh N.B. et al. Evaluation of the Effect of Cariprazine on Memory and Cognition in Experimental Rodent Models. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(22):14748. DOI: 10.3390/ijerph192214748
  21. Hussein A.M., Bezu M., Korz V. Evaluating Working Memory on a T-maze in Male Rats. *Bio Protoc* 2018;8(14):e2930. DOI: 10.21769/BioProtoc.2930
  22. Cardoso C.V., de Barros M.P., Bachi A.L.L. et al. Chemobrain in rats: Behavioral, morphological, oxidative and inflammatory effects of doxorubicin administration. *Behav Brain Res* 2020;378:112233. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112233
  23. Okudan N., Belviranli M., Sezer T. Potential Protective Effect of Coenzyme Q10 on Doxorubicin-Induced Neurotoxicity and Behavioral Disturbances in Rats. *Neurochem Res* 2022;47(5):1280–9. DOI: 10.1007/s11064-021-03522-8
  24. Alves R., de Carvalho J.D.B., Benedito M.A.C. High and low rearing subgroups of rats selected in the open field differ in the activity of K<sup>+</sup>-stimulated p-nitrophenylphosphatase in the hippocampus. *Brain Res* 2005;1058(1–2):178–82. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.08.005
  25. Chiranth M., Rao G.M., Pandey R. et al. Ameliorating effect of whey preparation on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and oxidative stress in chemotherapy induced rat model for brain toxicity. *Biomedicine* 2019;39(3):405–9.
  26. Khadrawy Y.A., El-Gizawy M.M., Sorour S.M. et al. Effect of curcumin nanoparticles on the cisplatin-induced neurotoxicity in rat. *Drug Chem Toxicol* 2019;42(2):194–202. DOI: 10.1080/01480545.2018.1504058
  27. Liedke P.E.R., Reolon G.K., Kilpp B. et al. Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94(2):239–43. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.09.001
  28. Maurer G.S., Clayton Z.S. Anthracycline chemotherapy, vascular dysfunction and cognitive impairment: burgeoning topics and future directions. *Future Cardiol* 2023;19(11):547–66. DOI: 10.2217/fca-2022-0086

#### Вклад авторов

В.А. Полозкова: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

М.И. Трещалин, С.Г. Язерян: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

А.Е. Щекотихин: разработка дизайна исследования;

Э.Р. Переверзева: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи.

#### Author's contributions

V.A. Polozkova: research design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;

M.I. Treshchalin, S.G. Yazyerian: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

A.E. Shchekotikhin: research design development;

E.R. Pereverzeva: research design development, review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

В.А. Полозкова / V.A. Polozkova: <https://orcid.org/0000-0001-8643-6427>

М.И. Трещалин / M.I. Treshchalin: <https://orcid.org/0000-0002-5652-8686>

С.Г. Язерян / S.G. Yazeryan: <https://orcid.org/0000-0001-8781-6376>

А.Е. Щекотихин / A.E. Shchekotikhin: <https://orcid.org/0000-0002-6595-0811>

Э.Р. Переверзева / E.R. Pereverzeva: <https://orcid.org/0000-0001-7368-9695>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания «Исследование механизмов резистентности и фармакологического действия антибактериальных и противоопухолевых препаратов».

**Funding.** The work was conducted within the framework of the state project “Research of the mechanisms of resistance and the pharmacological action of antibacterial and anticancer drugs”.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф. Гаузе», протокол исследования № 2-2024 от 22.01.2024.

**Conformity of the principles of bioethics.** The study was conducted in accordance with European Convention on the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. This study was evaluated and approved by the local ethical committee of the Gause Institute of New Antibiotics (Protocol No. 2-2024 dated 22.01.2024).

Статья поступила: 23.02.2025. Принята к публикации: 13.05.2025. Опубликовано онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 23.02.2025. Accepted for publication: 13.05.2025. Published online: 27.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-56-65>

# Физико-химические и термические исследования твердых дисперсий дезлоратадина

Ю.А. Полковникова, Д.Д. Бегинина, У.А. Тульская, А.С. Леньшин, А.А. Головина

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»; Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл., 1

**Контакты:** Юлия Александровна Полковникова [juli-polk@mail.ru](mailto:juli-polk@mail.ru)

**Введение.** В настоящее время для повышения растворимости и скорости растворения плохо растворимых в воде фармацевтических субстанций возможно использовать различные подходы, такие как образование солей, солюбилизация сорастворителями, уменьшение размера частиц или приготовление твердых дисперсий. Перспективным и актуальным направлением в фармацевтической науке представляется получение твердых дисперсий. В качестве полимеров-носителей при производстве твердых дисперсий чаще всего используют поливинилпирролидон и полиэтиленгликоли различной молекулярной массы.

**Цель исследования** – анализ твердых дисперсий дезлоратадина физико-химическими и термическим методами для обоснования оптимального состава и технологии получения твердых дисперсий.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использованы твердые дисперсии дезлоратадина с полиэтиленгликолем-1500, полиэтиленгликолем-4000, полиэтиленгликолем-6000, поливинилпирролидон-10000 в качестве носителей в соотношениях 1:1, 1:2, 1:5. Для определения морфологических особенностей полученных образцов использовали растровую электронную микроскопию на приборе JSM-6380LV (JEOL, Япония). Инфракрасную (ИК) спектроскопию проводили на приборе Vertex-70 (Bruker Optik GmbH, Германия), в средней ИК-области в диапазоне 4000–400 см<sup>-1</sup> методом нарушенного полного внутреннего отражения. С целью изучения кристаллической структуры твердых дисперсий с полимерными носителями проводили рентгенофазный анализ методом порошковой рентгеновской дифрактометрии на приборе типа «ДРОН». Исследования методом дифференциальной сканирующей калориметрии осуществляли на приборе синхронного термического анализа модели STA 449 F3 (Netzsch, Германия).

**Результаты.** ИК-спектры твердых дисперсий дезлоратадина продемонстрировали колебания в областях, соответствующих функциональным группам фармацевтической субстанции и полимерам. На рентген-дифрактограмме образцов твердых дисперсий дезлоратадина с полимерами наблюдается потеря фармацевтической субстанцией кристаллической структуры. При проведении дифференциальной сканирующей калориметрии установлено наименьшее значение удельной теплоты комплексообразования у твердых дисперсий дезлоратадина с полиэтиленгликолем-1500 и полиэтиленгликолем-6000.

**Закключение.** Оптимальным полимером для получения твердых дисперсий является полиэтиленгликоль-1500.

**Ключевые слова:** твердые дисперсии, дезлоратадин, инфракрасная спектроскопия, рентгенофазный анализ

**Для цитирования:** Полковникова Ю.А., Бегинина Д.Д., Тульская У.А. и др. Физико-химические и термические исследования твердых дисперсий дезлоратадина. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):56–65. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-56-65>

## Physical-chemical and thermal studies of solid dispersions of desloratadine

Yuliya A. Polkovnikova, Daria D. Beginina, Ulyana A. Tulskeya, Alexandr S. Lenshin, Anastasia A. Golovina

Voronezh State University; 1 Universitetskaya pl., Voronezh 394018, Russia

**Contacts:** Yuliya Alexandrovna Polkovnikova [juli-polk@mail.ru](mailto:juli-polk@mail.ru)

**Background.** Currently, various approaches can be used to increase the solubility and dissolution rate of poorly water-soluble pharmaceutical substances, such as salt formation, solubilization with co-solvents, particle size

reduction, or preparation of solid dispersions. A promising and relevant area in pharmaceutical science is the production of solid dispersions. Polyvinylpyrrolidone and polyethyleneglycols of various molecular weights are most often used as carrier polymers in the production of solid dispersions.

**Aim.** Analysis of desloratadine solid dispersions by physicochemical and thermal methods in order to substantiate the most optimal composition and technology for obtaining solid dispersions.

**Materials and methods.** Solid dispersions of desloratadine with polyethyleneglycol-1500, polyethyleneglycol-4000, polyethyleneglycol-6000, polyvinylpyrrolidone-10000 as carriers in the ratios of 1:1, 1:2, 1:5 were used as objects of study. To determine the morphological features of the obtained samples, scanning electron microscopy was used on a JSM-6380LV device (JEOL, Japan). IR spectroscopy was performed on a Vertex-70 device (Bruker Optik GmbH, Germany), in the mid-IR region of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  using the total internal reflection method. In order to study the crystal structure of solid dispersions with polymer carriers, X-ray phase analysis was performed using the powder X-ray diffractometry method on a DRON device. Studies by the differential scanning calorimetry (DSC) method were carried out on a synchronous thermal analysis device model STA 449 F3 (Netzsch, Germany).

**Results.** IR spectra of desloratadine solid dispersions demonstrated fluctuations in the areas corresponding to the functional groups of the pharmaceutical substance and polymers. The X-ray diffraction pattern of samples of desloratadine solid dispersions with polymers shows a loss of the crystalline structure of the pharmaceutical substance. When conducting differential scanning calorimetry, the lowest value of specific heat of complexation was found for solid dispersions of desloratadine with polyethyleneglycol-1500 and polyethyleneglycol-6000.

**Conclusion.** The conducted studies showed that the optimal polymer for obtaining solid dispersions is polyethyleneglycol-1500

**Keywords:** solid dispersions, desloratadine, infrared spectroscopy, X-ray phase analysis

**For citation:** Polkovnikova Yu.A., Beginina D.D., Tulskeya U.A. et al. Physical-chemical and thermal studies of solid dispersions of desloratadine. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):56–65. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-56-65>

## Введение

Современные подходы к терапии аллергодерматозов подразумевают использование мягких лекарственных форм, преимущественно глюкокортикостероидов, оказывающих довольно серьезные побочные эффекты на организм и требующих постоянного врачебного контроля. Лекарственным средством 3-го поколения противоаллергического действия является дезлоратадин, 8-хлор-6,11-дигидро-11-(4-пиперидилиден)-5Н-бензо[5,6]циклопента[1,2-*b*]-пиридин, антагонист гистаминовых H1-рецепторов, имеющий доказанную безопасную и эффективную антигистаминную активность и нашедший применение при аллергическом рините, аллергической астме и крапивнице [1–3]. Дезлоратадин ингибирует важные цитокины и клеточную активность, что указывает на его противоаллергический и противовоспалительный профиль [4–6]. С учетом отсутствия мягкой лекарственной формы дезлоратадина разработка лекарственного средства с дезлоратадином расширит как его фармакологический спектр, так и номенклатуру мазей противоаллергического действия.

Существенным фактором, ограничивающим применение дезлоратадина, является его крайне низкая растворимость в воде, которая в значительной мере снижает терапевтический эффект лекарственных форм [7–9]. В настоящее время для повышения растворимости и скорости растворения плохо растворимых в воде фармацевтических субстанций можно

использовать различные подходы, такие как образование солей, солюбилизация соразстворителями, уменьшение размера частиц или приготовление твердых дисперсий (ТД) [10]. Метод ТД разработан Чиу и Ригельманом и широко используется в фармации для повышения растворимости, скорости растворения и абсорбции некоторых плохо растворимых в воде фармацевтических субстанций [11]. Водорастворимые носители, такие как полиэтиленгликоли (ПЭГ) и поливинилпирролидоны (ПВП), – наиболее распространенные полимерные носители, используемые для улучшения растворимости в ТД [12–16].

Физико-химические характеристики являются определяющими для успешной разработки ТД, включая определение кристалличности лекарств и молекулярных взаимодействий [17, 18]. Так, обнаружение молекулярных взаимодействий позволяет объяснить различные характеристики лекарственных средств (например, растворение, растворимость, стабильность) в ТД [19, 20]. Данные этих исследований будут способствовать выбору оптимального состава при разработке лекарственных препаратов. Таким образом, изучение молекулярных взаимодействий в ТД позволит получить важную информацию и требует обширного исследования [21–23].

**Цель исследования** – анализ ТД дезлоратадина физико-химическими и термическими методами для обоснования оптимального состава и технологии получения ТД.

### Материалы и методы

В экспериментальных исследованиях использованы в качестве активной фармацевтической субстанции дезлоратадин (Ph. Eur, USP/NF) (рис. 1) и вспомогательные вещества (полимеры-носители), разрешенные к медицинскому применению и отвечающие требованиям нормативной документации: ПВП, ПЭГ-1500, ПЭГ-4000, ПЭГ-6000 (Ph. Eur, USP/NF).

Образцы ТД готовили в 3 различных соотношениях фармацевтической субстанции с полимерами-носителями (1:1, 1:2 и 1:5 по массе).

Образцы ТД с ПВП получали методом удаления растворителя, в качестве которого использовали 96 % этиловый спирт. Дезлоратадин и ПВП совместно растворяли в 96 % этиловом спирте с последующим удалением этанола при температуре 55–57 °С в течение 6–8 ч. Данная технология была выбрана в связи с хорошей растворимостью дезлоратадина в 96 % этиловом спирте и высокой температурой плавления ПВП (159 °С).

Образцы ТД с ПЭГ получали методом совместного плавления дезлоратадина со вспомогательными веществами [24].

Структура поверхности представляет важную информацию о пористости микросистем доставки лекарственных средств [25]. Для определения морфологических особенностей полученных образцов использовали растровую электронную микроскопию на приборе JSM-6380LV (JEOL, Япония). Исследование непроводящих образцов методами растровой электронной микроскопии потребовало разработки специальной методики нанесения на исследуемую поверхность проводящего покрытия, стойкого к окислению в атмосферных условиях при воздействии электронного пучка. На модельных образцах посредством электродугового реактивного осаждения был отработан способ напыления пленки золота.

Инфракрасную (ИК) спектроскопию проводили на приборе Vertex-70 (Bruker Optik GmbH, Германия),

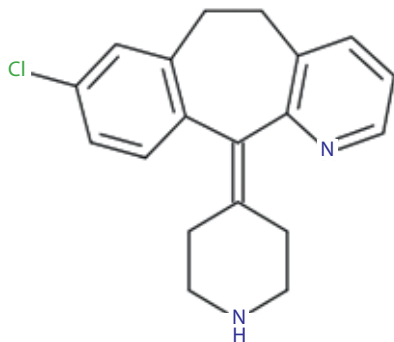


Рис. 1. Химическая структура дезлоратадина

Fig. 1. Chemical structure of desloratadine

в средней ИК-области в диапазоне 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  техникой нарушенного полного внутреннего отражения [26].

С целью изучения кристаллической структуры ТД с полимерными носителями проводили рентгенофазный анализ методом порошковой рентгеновской дифрактометрии на приборе типа «ДРОН» с излучением  $\text{CuK}\alpha$  при условиях: напряжение – 30 кВ, ток трубки – 20 мА, время наборов импульсов – 3 с. Режим сканирования по программе Express: шаг – 0,05 град/2θ. В качестве наполнителя при изготовлении образцов использовали вазелиновое масло [26].

Исследования методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили на приборе синхронного термического анализа модели STA 449 F3 (Netzsch, Германия) при следующих режимах: давление – атмосферное, максимальная температура – 588 °К, скорость изменения температуры – 5 °К/мин. Опыты проводили в алюминиевых тиглях. Для обработки полученных кривых ТГ (зависимости изменения массы навески от температуры или времени) использовали программное обеспечение Netzsch Proteus (Netzsch, Германия). Нагревание проводили при атмосферном давлении. По кривым нагревания строили диаграммы состояния исследуемой системы.

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с ОФС 1.1.0013 Государственной фармакопеи XV издания [7].

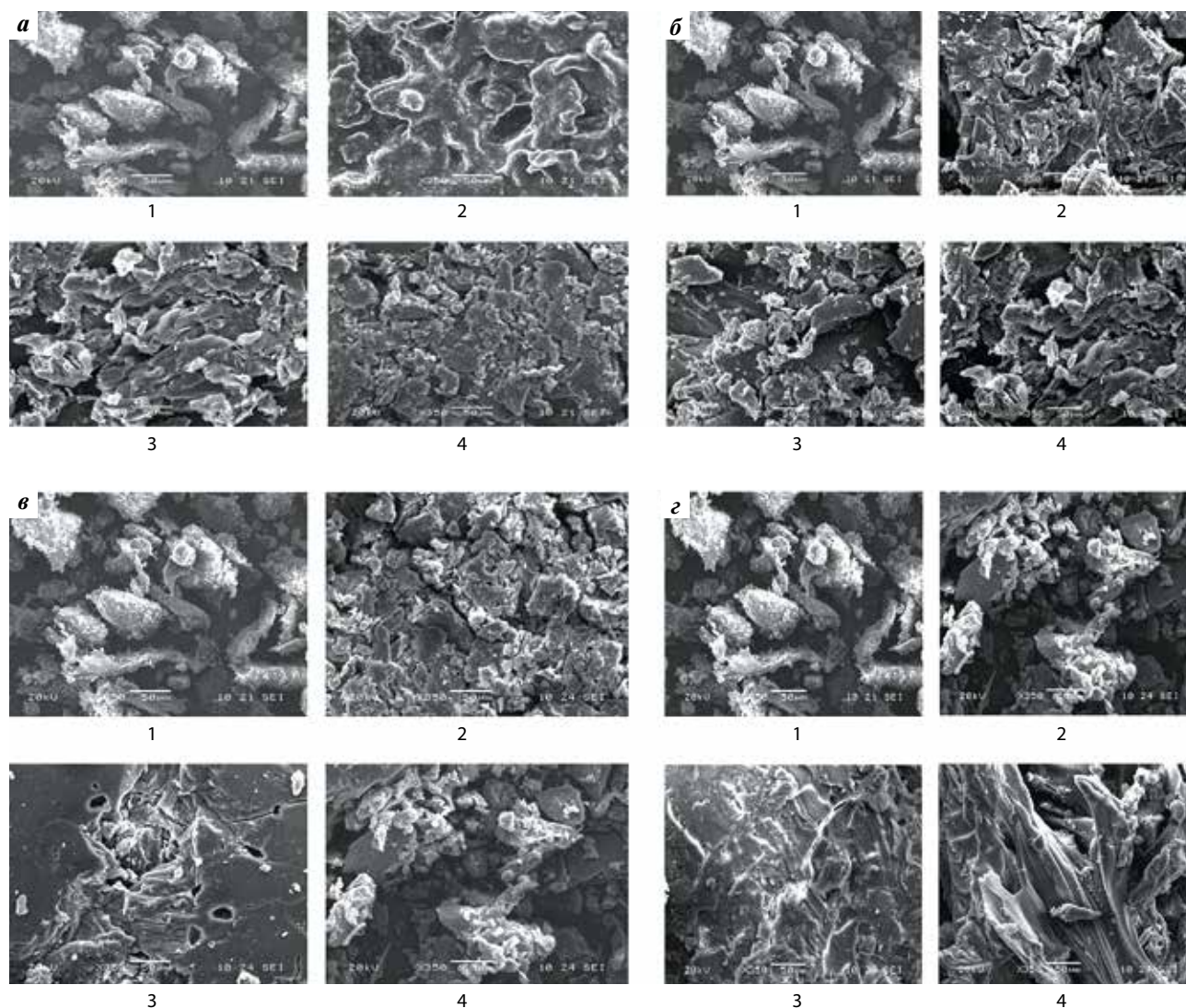
### Результаты и обсуждение

По данным растровой электронной микроскопии ТД дезлоратадина с ПЭГ-1500 в соотношении 1:1 представляет собой вязкую массу с включениями, предположительно активной фармацевтической субстанции дезлоратадина. Поверхность ТД с ПЭГ-1500 в соотношениях 1:2 и 1:5 – слоистая чешуйчатая структура, при увеличении количества полимера чешуйки заметно уменьшаются в размере (рис. 2, а).

При использовании полимера с большей молекулярной массой (ПЭГ-4000) образование чешуйчатых структур наблюдается уже в соотношении 1:1, хотя более выраженными они становятся при соотношении 1:5 (рис. 2, б).

Для ТД дезлоратадина с ПЭГ-6000 характерно образование мелкочешуйчатых структур, аналогичных тем, что получены при использовании ПЭГ-4000 (соотношение 1:1). При увеличении количества полимера на относительно плоской поверхности ТД наблюдают несколько крупных трещин и гранул и выдающихся вверх крупных хорошо выраженных кристаллических структур (рис. 2, в).

По внешним характеристикам ТД дезлоратадина с ПВП (соотношение 1:1) похожа на ТД с ПЭГ-6000 1:1. Однако при увеличении количества полимера



**Рис. 2.** Результаты растровой электронной микроскопии твердых дисперсий, увеличение 1:220: а – дезлоратадин (1); дезлоратадин: полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1500 1:1 (2); дезлоратадин: ПЭГ-1500 1:2 (3); дезлоратадин: ПЭГ-1500 1:5 (4); б – дезлоратадин (1); дезлоратадин: ПЭГ-4000 1:1 (2); дезлоратадин: ПЭГ-4000 1:2 (3); дезлоратадин: ПЭГ-4000 1:5 (4); в – дезлоратадин (1); дезлоратадин: ПЭГ-6000 1:1 (2); дезлоратадин: ПЭГ-6000 1:2 (3); дезлоратадин: ПЭГ-6000 1:5 (4); г – дезлоратадин (1); дезлоратадин: поливинилпирролидон (ПВП) 1:1 (2); дезлоратадин: ПВП 1:2 (3); дезлоратадин: ПВП 1:5 (4)

**Fig. 2.** Results of scanning electron microscopy solid dispersions, magnification 1:220: а – desloratadine (1); desloratadine: polyethylene glycol (PEG) 1500 1:1 (2); desloratadine: PEG-1500 1:2 (3); desloratadine: PEG-1500 1:5 (4); б – desloratadine (1); desloratadine: PEG-4000 1:1 (2); desloratadine: PEG-4000 1:2 (3); desloratadine: PEG-4000 1:5 (4); в – desloratadine (1); desloratadine: PEG-6000 1:1 (2); desloratadine: PEG-6000 1:2 (3); desloratadine: PEG-6000 1:5 (4); г – desloratadine (1); desloratadine: polyvinylpyrrolidone (PVP) 1:1 (2); desloratadine: PVP 1:2 (3); desloratadine: PVP 1:5 (4)

(соотношения 1:2 и 1:5) отмечены относительно плоская поверхность ТД с незначительными неровностями в виде возвышенностей и углублений и отчетливо выраженные структуры неправильной формы, выступающие вверх (рис. 2, г).

Методом ИК-Фурье спектроскопии проведена идентификация дезлоратадина в образцах всех ТД (рис. 3).

В ИК-спектре субстанции дезлоратадина получены следующие характеристические частоты: 3315  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая валентным колебаниям

вторичной аминогруппы, 2913  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая валентным колебаниям С–Н связи в алициклических соединениях, 1537  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая валентным колебаниям двойной связи между углеродом и азотом, 442  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая валентным колебаниям связи «углерод–хлор».

Для ИК-спектра ТД дезлоратадина с ПЭГ-1500 (соотношение 1:1) сохраняются пики в районе 1587  $\text{см}^{-1}$ , а также колебания в районе 490  $\text{см}^{-1}$ , что может соответствовать валентным колебаниям органически связанного атома хлора. ИК-спектры

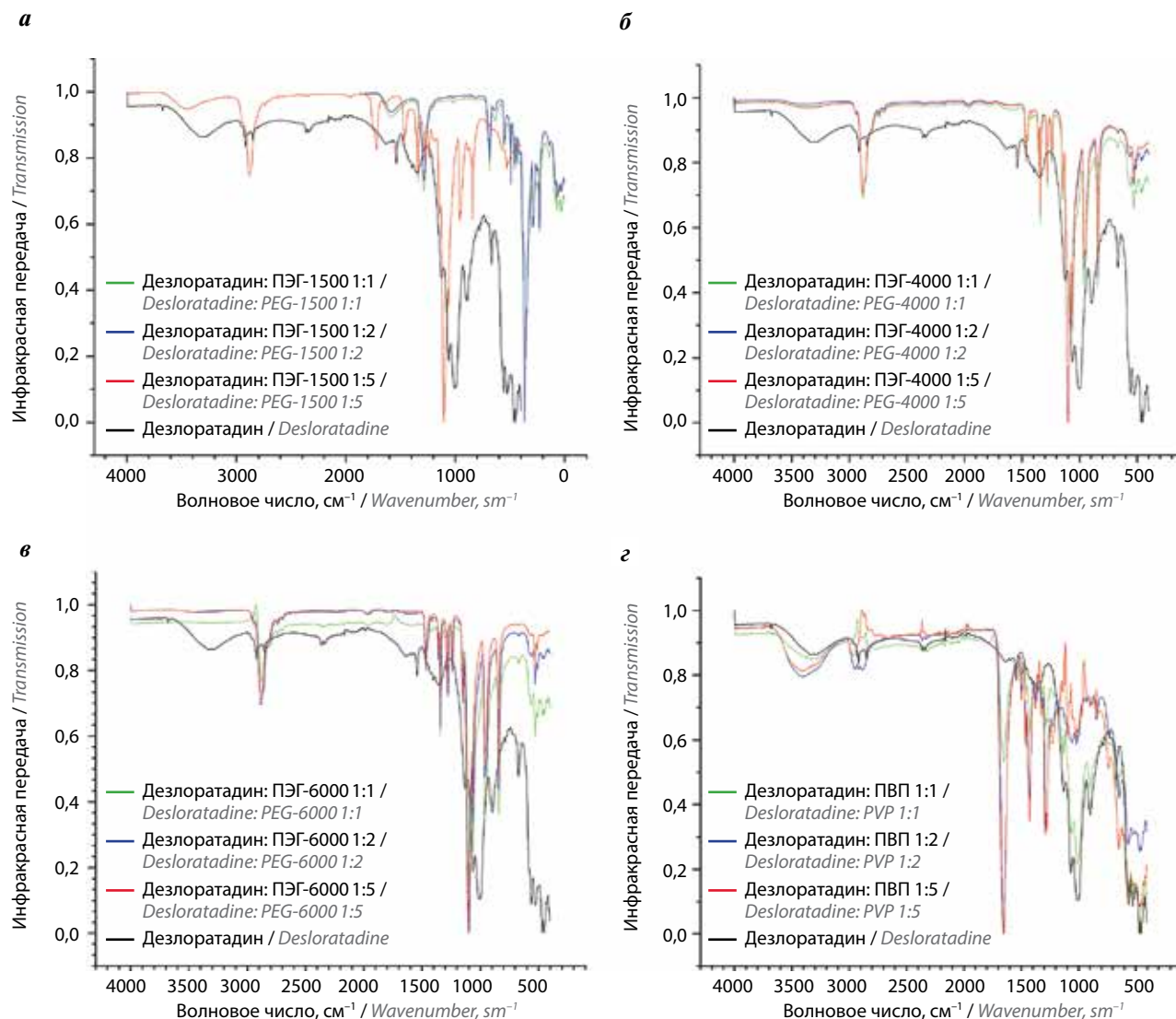


Рис. 3. Инфракрасные спектры твердых дисперсий дезлоратадина с полимерами: а – полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1500; б – ПЭГ-4000; в – ПЭГ-6000; г – поливинилпирролидон (ПВП)

Fig. 3. Infrared spectra of desloratadine solid dispersions with polymers: а – polyethylene glycol (PEG) 1500; б – PEG-4000; в – PEG-6000; г – polyvinylpyrrolidone (PVP)

ТД дезлоратадина с ПЭГ-1500 в соотношении 1:2 также демонстрируют колебания в областях, соответствующих данным функциональным группам.

ИК-спектр твердой дисперсной системы дезлоратадина с ПЭГ-1500 (соотношение 1:5) демонстрирует смещение пиков в области 2000–1500  $\text{см}^{-1}$  (вероятно, в связи с большей концентрацией полимера), однако все еще можно обнаружить колебания в области 2880  $\text{см}^{-1}$  (валентные колебания С–Н связи в алициклических соединениях), 1108  $\text{см}^{-1}$  (валентные колебания двойной связи между углеродом и азотом) и 527  $\text{см}^{-1}$  (органически связанный хлор). ИК-спектр ТД дезлоратадина с ПЭГ-4000 и ПЭГ-6000 также сохраняет все пики, характерные для субстанции дезлоратадина, за исключением пика в области

3450–3300  $\text{см}^{-1}$ , соответствующего валентным колебаниям вторичной аминогруппы.

Для ИК-спектра ТД дезлоратадина с ПВП также сохраняются пики в следующих областях: 3450–3300  $\text{см}^{-1}$ , что соответствует вторичной аминогруппе; 3090–2860  $\text{см}^{-1}$ , что соответствует связи между углеродом и азотом в алициклических соединениях, в области 1690–520  $\text{см}^{-1}$ , что соответствует двойной связи между углеродом и азотом, а также в области 800–600  $\text{см}^{-1}$ , соответствующей связи «углерод–хлор» в хлорорганических соединениях.

Изменение интенсивности и небольшие колебания в изменении длин волн пиков вещества могут указывать на присутствие неспецифических взаимодействий (дисперсионных, ван-дер-ваальсовых).

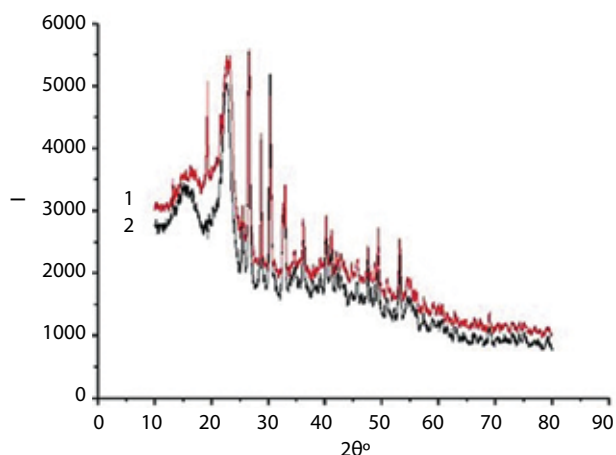


Рис. 4. Рентгенограмма субстанции дезлоратадина (1) и твердых дисперсий дезлоратадина с полиэтиленгликолем 1500 (2)

Fig. 4. X-ray image of desloratadine substance (1) and desloratadine solid dispersions with polyethylene glycol 1500 (2)

Образование ТД, как правило, сопровождается потерей фармацевтической субстанции кристаллической структуры (аморфизацией). На рентген-дифрактограмме (рис. 4) данный процесс выглядит как изменение характера и интенсивности дифракционных пиков по сравнению с рентген-дифрактограммой исходной субстанции.

Методом ДСК изучены фазовые равновесия составов первичной твердой дисперсной системы дезлоратадина с полимерами (рис. 5–8).

На ДСК-термограмме ТД дезлоратадина с ПЭГ-1500 представлен слабо выраженный эндотермический пик, который имеет ярко выраженное начало при температуре 37,2 °С и окончание при температуре 46,2 °С, его площадь – 7,839 Дж/г, максимальная амплитуда пика фиксирована при температуре 42,4 °С.

На ДСК-термограмме ТД дезлоратадина с ПЭГ-4000 наблюдается ярко выраженный эндотермический пик с началом при 58,5 °С и окончанием при 63,1 °С, площадь пика – 85,48 Дж/г, его максимальная амплитуда фиксирована при 61,1 °С.

На ДСК-термограмме ТД дезлоратадина с ПЭГ-6000 эндотермический пик имеет начало при 58,2 °С и конец при 66,2 °С, площадь пика составила 78,59 Дж/г, а его максимальная амплитуда наблюдается при температуре 62,5 °С.

На ДСК-термограмме ТД дезлоратадина с ПВП наблюдается эндотермический пик, растянутый в диапазоне температур с началом при 36,1 °С и концом при 64 °С, его площадь составляет 152 Дж/г.

Проведено сравнение удельной теплоты комплекссообразования различных дисперсных систем дезлоратадина (рис. 9).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что комплексы дезлоратадина с ПЭГ-1500 образуются легче, чем комплексы с другими полимерами, так как значение удельной теплоты комплекссообразования дезлоратадина с ПЭГ-1500 минимально – 7,839 Дж/г.

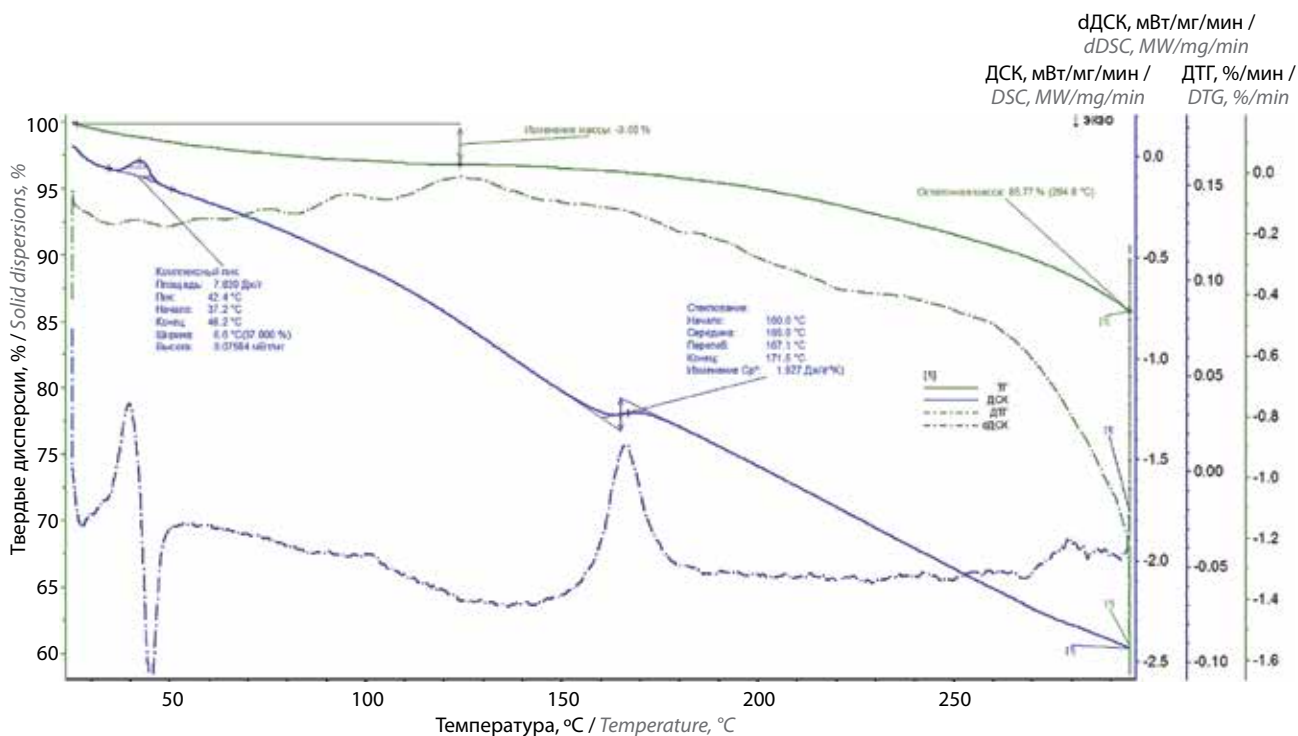


Рис. 5. Термограмма твердых дисперсий дезлоратадина с полиэтиленгликолем 1500 (соотношение дезлоратадина/полимера 1:2)

Fig. 5. Thermogram of desloratadine solid dispersions with polyethylene glycol 1500 (desloratadine/polymer ratio 1:2)

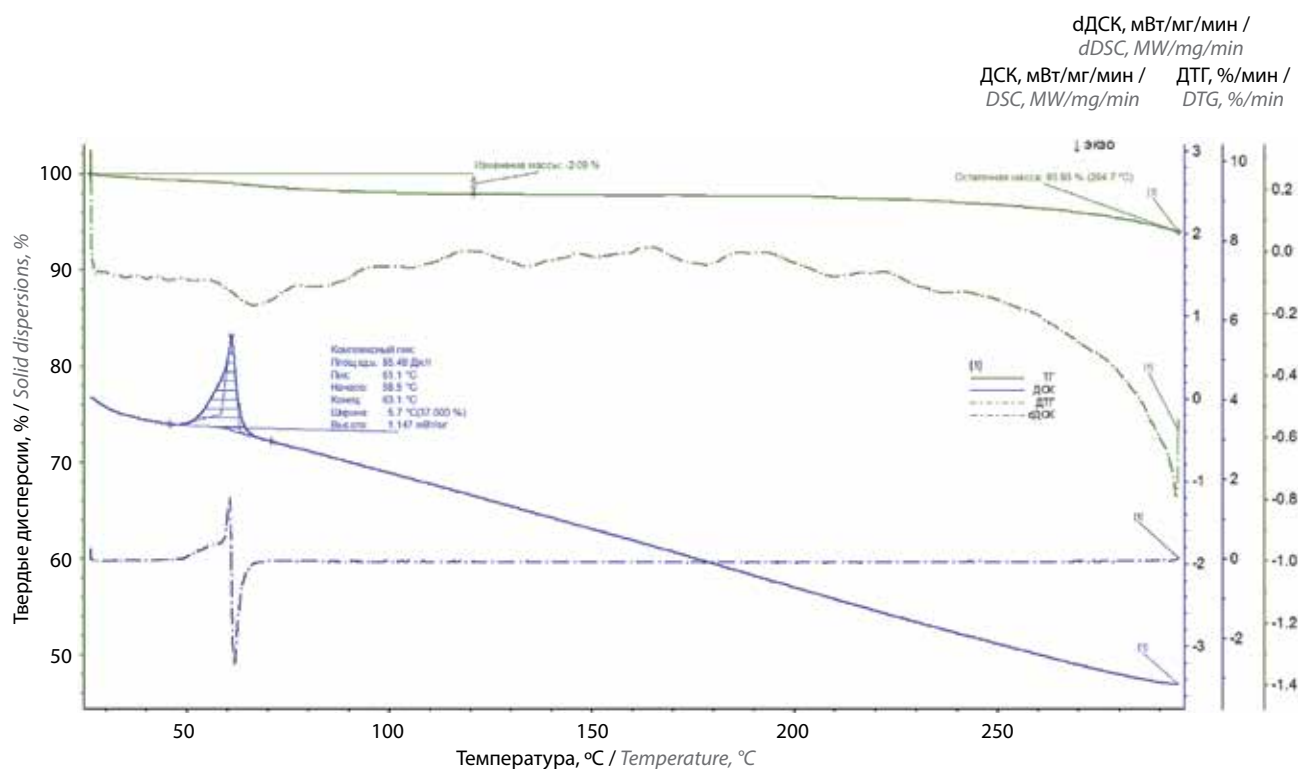


Рис. 6. Термограмма твердых дисперсий дезлоратадина с полиэтиленгликолем 4000 (1:2)

Fig. 6. Thermogram of desloratadine solid dispersions with polyethylene glycol 4000 (desloratadine/polymer ratio 1:2)

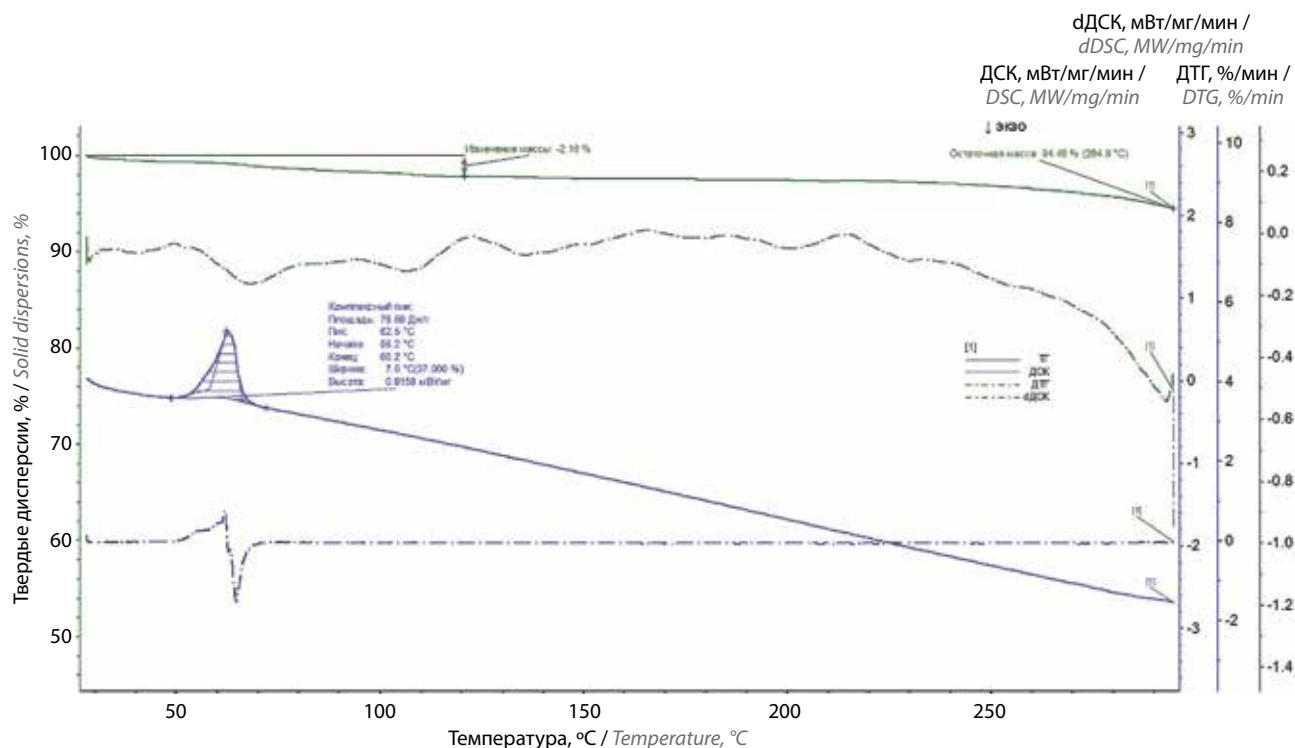


Рис. 7. Термограмма твердых дисперсий дезлоратадина с полиэтиленгликолем 6000 (1:2)

Fig. 7. Thermogram of desloratadine solid dispersions with polyethylene glycol 6000 (desloratadine/polymer ratio 1:2)

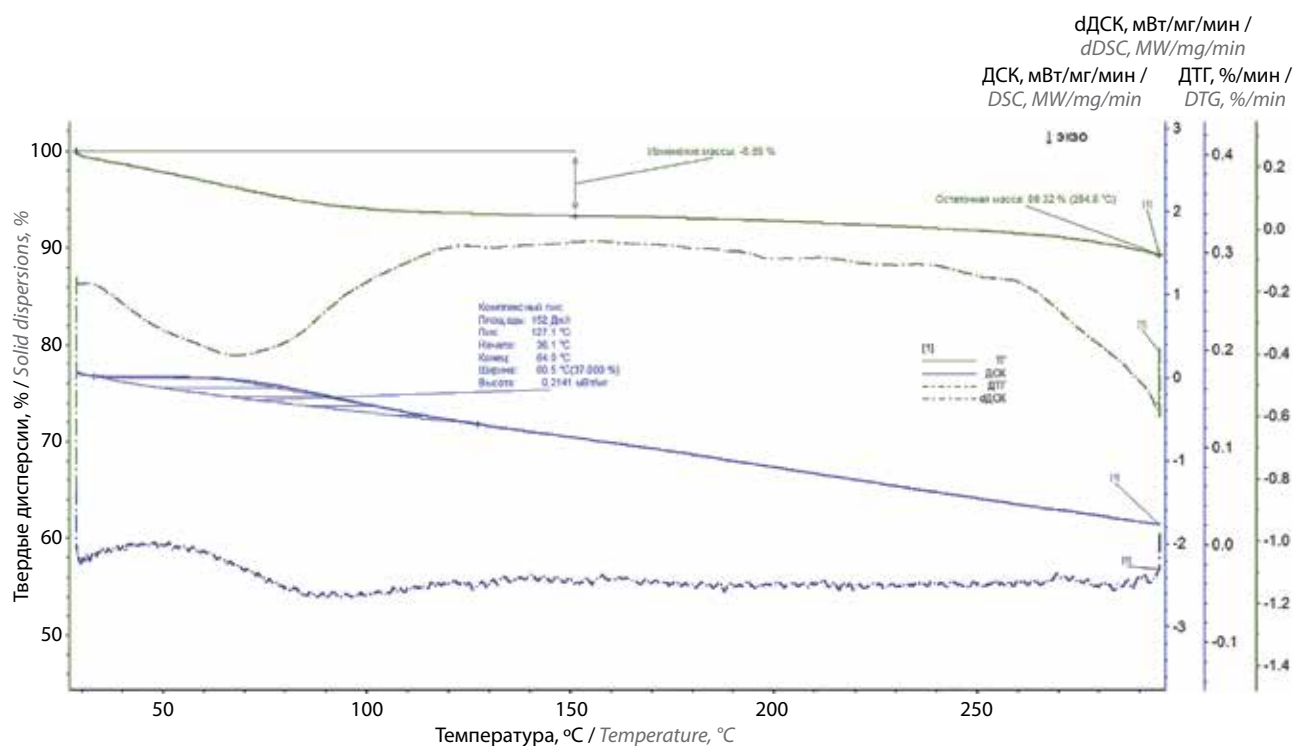


Рис. 8. Термограмма твердых дисперсий дезлоратадина с поливинилпирролидоном (1:2)

Fig. 8. Thermogram of desloratadine solid dispersions with polyvinylpyrrolidone (desloratadine/polymer ratio 1:2)

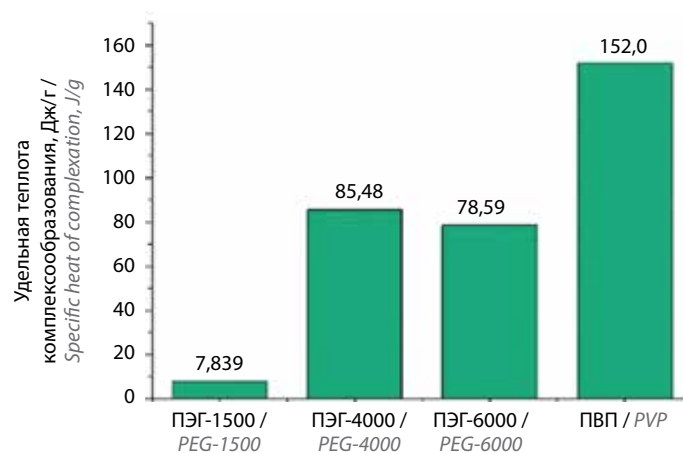


Рис. 9. Удельная теплота комплексообразования различных дисперсных систем дезлоратадина: полиэтиленгликоля (ПЭГ) и поливинилпирролидона (ПВП)

Fig. 9. Specific heat of complexation of various dispersed systems of desloratadine: polyethylene glycol (PEG) and polyvinylpyrrolidone (PVP)

### Заключение

В ходе работы установлено, что ИК-спектры ТД дезлоратадина с полимерами демонстрируют колебания в областях, соответствующих функциональным группам дезлоратадина и полимерных носителей

(ПВП, ПЭГ). Сравнительно низкое значение удельной теплоты комплексообразования ТД дезлоратадина с ПЭГ-1500, которое составляет 7,839 Дж/г, позволяет рекомендовать ее в качестве оптимальной при производстве мягких лекарственных форм дезлоратадина.

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

- Shi Z., Wang C., Sun C.C. Molecular origin of the distinct tabletability of loratadine and desloratadine: role of the bonding area — bonding strength interplay. *Pharm Res* 2020;37(7):133. DOI: 10.1007/s11095-020-02856-2
- Wen Y., Tang Y., Li M., Lai Y. Efficiency and safety of desloratadine in combination with compound glycyrrhizin in the treatment of chronic urticaria: a meta-analysis and systematic review of randomised controlled trials. *Pharm Biol* 2021;59(1):1276–85. DOI: 10.1080/13880209.2021.1973039
- González-Núñez V., Valero A., Mullol J. Safety evaluation of desloratadine in allergic rhinitis. *Expert Opin Drug Saf* 2013;12(3):445–53. DOI: 10.1517/14740338.2013.788148
- DuBuske L.M. Review of desloratadine for the treatment of allergic rhinitis, chronic idiopathic urticaria and allergic inflammatory disorders. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6:2511–23. DOI: 10.1517/14656566.6.14.2511
- Li F., Xu Q., Zhu Q. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel desloratadine derivatives with anti-inflammatory and H(1) antagonize activities. *Bioorg Med Chem Lett* 2019;29(24):126712. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.126712
- Bernstein J.A., Bernstein J.S., Makol R., Ward S. Allergic rhinitis: a review. *JAMA* 2024;331(10):866–77. DOI: 10.1001/jama.2024.0530
- Государственная фармакопея РФ XV. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (In Russ.).
- Berginc K., Sibinovska N., Žakelj S. et al. Biopharmaceutical classification of desloratadine — not all drugs are classified the easy way. *Acta Pharm* 2020;70(2):131–44. DOI: 10.2478/acph-2020-0006
- Ali S.M., Upadhyay S.K., Maheshwari A. NMR spectroscopic study of the inclusion complex of desloratadine with  $\beta$ -cyclodextrin in solution. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2007;59:351–5. DOI: 10.1007/s10847-007-9335-y
- Barea S.A., Mattos C.B., Cruz A.C. et al. Solid dispersions enhance solubility, dissolution, and permeability of thalidomide. *Drug Dev Ind Pharm* 2017;43(3):511–8. DOI: 10.1080/03639045.2016.1268152
- Liu X., Zhang Z., Jiang Y. et al. Novel PEG-grafted nanostructured lipid carrier for systematic delivery of a poorly soluble antileukemia agent Tamibarotene: characterization and evaluation. *Drug Deliv* 2015;22(2):223–9. DOI: 10.3109/10717544.2014.885614
- Huang B.B., Liu D.X., Liu D.K., Wu G. Application of solid dispersion technique to improve solubility and sustain release of emamectin benzoate. *Molecules* 2019;24(23):4315. DOI: 10.3390/molecules24234315
- Polkovnikova Yu.A., Glizhova T.N., Arutyunova N.V., Sokulskaya N.N. PEG-4000 increases solubility and dissolution rate of vinpocetin in solid dispersion system. *Chimica Techno Acta* 2022;9(S):202292S11. DOI: 10.15826/chimtech.2022.9.2.S11
- Ben Osman Y., Liavitskaya T., Vyazovkin S. Polyvinylpyrrolidone affects thermal stability of drugs in solid dispersions. *Int J Pharm* 2018;551(1–2):111–20. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.020
- Andrews G.P., AbuDiak O.A., Jones D.S. Physicochemical characterization of hot melt extruded bicalutamide-polyvinylpyrrolidone solid dispersions. *J Pharm Sci* 2010;99(3):1322–35. DOI: 10.1002/jps.21914
- Le Khanh H.P., Haimhoffer Á., Nemes D. et al. Effect of molecular weight on the dissolution profiles of peg solid dispersions containing ketoprofen. *Polymers* 2023;15(7):1758. DOI: 10.3390/polym15071758
- Bolourchian N., Mahboobian M.M., Dadashzadeh S. The effect of PEG molecular weights on dissolution behavior of simvastatin in solid dispersions. *Iran J Pharm Res* 2013;12:11–20. PMID: 24250667
- Краснюк (мл.) И.И., Беляцкая А.В., Краснюк И.И. и др. Влияние полимеров на физико-химические свойства бензонала в твердых дисперсиях. Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2021;62(1):44–8. Krasnyuk (Jr) I.I., Beliatskaya A.V., Krasnyuk I.I. et al. Effect of polymers on the physical and chemical properties of benzonal in solid dispersions. *Vestnik Moskovskogo universiteta = Bulletin of the Moscow University. Series 2: Chemistry* 2021;62(1):44–8. (In Russ.).
- Jelić D. Thermal stability of amorphous solid dispersions. *Molecules* 2021;26(1):238. DOI: 10.3390/molecules26010238
- Tran T.T.D., Tran P.H.L. Molecular interactions in solid dispersions of poorly water-soluble drugs. *Pharmaceutics* 2020;12(8):745. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080745
- Park C., Meghani N., Loebenberg R. et al. Fatty acid chain length impacts nanonizing capacity of albumin-fatty acid nanomicelles: Enhanced physicochemical property and cellular delivery of poorly water-soluble drug. *Eur J Pharm Biopharm* 2020;152:257–69. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.05.011
- Tran T.T.D., Tran P.H.-L., Lim J. et al. Physicochemical principles of controlled release solid dispersion containing a poorly water-soluble drug. *Ther Deliv* 2010;1:51–62. DOI: 10.4155/tde.10.3
- Sarabu S., Kallakunta V.R., Bandari S. et al. Hypromellose acetate succinate based amorphous solid dispersions via hot melt extrusion: effect of drug physicochemical properties. *Carbohydr Polym* 2020;233:115828. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115828
- Полковникова Ю.А., Корянова К.Н., Василевская Е.С. Влияние твердых дисперсий с ПЭГ-1500 на характер высвобождения винпоцетина. Биофармацевтический журнал 2019;11(5):69–76. Polkovnikova Yu.A., Koryanova K.N., Vasilevskaya E.S. The effect of solid dispersions with PEG-1500 on the release of vinpocetine. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal* 2019;11(5):69–76. (In Russ.).
- Polkovnikova Yu.A., Severinova N.A., Koryanova K.N. et al. Morphological, technological and biopharmaceutical studies of alginate-chitosan microcapsules with vinpocetine. *Pharmacy & Pharmacology* 2019;7(5):279–90. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-279-290
- Polkovnikova Yu.A., Chistyakova V.M. Physicochemical and biopharmaceutical studies of solid dispersions of cinnarizine. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2023;57(3):424–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-3-45-49

**Вклад авторов**

Ю.А. Полковникова: разработка концепции дизайна исследования, проведение эксперимента, написание текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации;

Д.Д. Бегина, У.А. Тульская: проведение эксперимента, редактирование рукописи;

А.С. Леншин: работа с источниками литературы, участие в формулировании выводов;

А.А. Головина: работа с источниками литературы, проведение эксперимента.

**Author's contributions**

Yu.A. Polkovnikova: research design concept development, conducting the experiment, writing the text of the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication;

D.D. Beginina, U.A. Tulskaia: conducting the experiment, editing the manuscript;

A.S. Lenshin: searched and analysed literature sources, interpreted the study results;

A.A. Golovina: searched and analysed literature sources, conducting the experiment.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Ю.А. Полковникова / Yu.A. Polkovnikova: <https://orcid.org/0000-0003-0123-9526>

Д.Д. Бегина / D.D. Beginina: <https://orcid.org/0009-0000-6543-2531>

У.А. Тульская / U.A. Tulskaia: <https://orcid.org/0000-0001-5775-9884>

А.С. Леншин / A.S. Lenshin: <https://orcid.org/0000-0002-1939-253X>

А.А. Головина / A.A. Golovina: <https://orcid.org/0009-0005-4763-7038>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-20015, <https://rscf.ru/project/24-25-20015/>.

**Funding.** This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 24-25-20015), <https://rscf.ru/en/project/24-25-20015/>.

Статья поступила: 18.06.2024. Принята в печать: 25.04.2025. Опубликовано онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 18.06.2024. Accepted for publication: 25.04.2025. Published online: 27.06.2025.

# Разработка состава и характеристика геля ранозаживляющего действия с L-аргинином

В.Ю. Рытченкова<sup>1</sup>, С.В. Рытченков<sup>1</sup>, Э.Ф. Степанова<sup>2</sup>, Д.С. Юдин<sup>3</sup>, С.В. Поройский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 414000 Астрахань, ул. Бакинская, 121;

<sup>2</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 357500 Пятигорск, пр-кт Калинина, 11;

<sup>3</sup>ФГКУ «Центр фармации и медицинской техники» Минобороны России; Россия, 141004 Мытищи, ул. Щорса, 1а

**Контакты:** Виктория Юрьевна Рытченкова [rytchenkovavy@mail.ru](mailto:rytchenkovavy@mail.ru)

**Введение.** В настоящее время вопросы терапии ран кожи и слизистых оболочек проявляются все более отчетливо. Одной из наиболее современных и востребованных лекарственных форм ранозаживляющих средств является гель, обладающий неоспоримыми фармакологическими и технологическими преимуществами. В качестве основного действующего компонента в разрабатываемой лекарственной форме использовали L-аргинин, являющийся субстратом для синтаз оксида азота (II) (NO (II)), при участии которых в организме происходит образование NO (II).

**Цель исследования** – выбор оптимального гелеобразователя и разработка состава мягкой лекарственной формы, применяемой для заживления ран кожных покровов и слизистых оболочек.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования выбраны 3 модельных образца гелей, изготовленных с использованием потенциально перспективных гелеобразователей: карбопола 940, натрий-карбоксиметилцеллюлозы, метилцеллюлозы. Реологические характеристики образцов изучали методом ротационной вискозиметрии на вискозиметре Fungilab Premium (Испания) с использованием измерительной системы «цилиндр в цилиндре». Для изучения биodeградации модельного образца использовали тестер растворения FADT-1202A (FOCS Co., Ltd, Китай), снабженный лопастью мешалкой. Степень высвобождения аргинина из образцов оценивали методом равновесного диализа по Кривчинскому.

**Результаты.** В результате исследования структурно-механических свойств модельных образцов выявлено, что метилцеллюлоза в сочетании с L-аргинином позволяет создать гелевую композицию, обладающую наибольшей стабильностью. При изучении биodeградации состава на основе метилцеллюлозы установили, что гель способен находиться на слизистой оболочке полости рта не более 60 мин. Далее с применением метода равновесного диализа по Кривчинскому в течение данного промежутка времени был установлен характер высвобождения L-аргинина из разработанного состава.

**Заключение.** В ходе проведенных исследований обоснован выбор основы ранозаживляющего геля. На основании полученных результатов выбрана метилцеллюлоза как оптимальный гелеобразователь для изготовления мягкой лекарственной формы с ранозаживляющим действием.

**Ключевые слова:** ранозаживляющий гель, аргинин, гелеобразователь, структурно-механическое свойство, высвобождение

**Для цитирования:** Рытченкова В.Ю., Рытченков С.В., Степанова Э.Ф. и др. Разработка состава и характеристика геля с L-аргинином ранозаживляющего действия. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):66–72.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-66-72>

## Development of the composition and characteristics of a wound-healing gel with L-arginine

Viktoria Yu. Rytchenkova<sup>1</sup>, Sergei V. Rytchenkov<sup>1</sup>, Eleonora F. Stepanova<sup>2</sup>, Dmitriy S. Yudin<sup>3</sup>, Sergei V. Poroyiski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Astrakhan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 121 Bakinskaya St., Astrakhan 414000, Russia;

<sup>2</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University, Ministry of Health of Russia; 11 Kalinina Prospekt, Pyatigorsk 357500, Russia;

<sup>3</sup>Center for Pharmacy and Medical Equipment; 1a Shchorsa St., Mytishchi 141004, Russia

**Contacts:** Viktoriya Yur'evna Rytchenkova [rytchenkovavy@mail.ru](mailto:rytchenkovavy@mail.ru)

**Background.** Currently, the issues of skin and mucous membrane wound therapy are becoming increasingly clear. One of the most modern and popular dosage forms of wound healing agents is a gel, which has undeniable pharmacological and technological advantages. L-arginine, which is a substrate for nitric oxide (II) (NO (II) synthases), which are involved in the formation of NO (II), was used as the main active ingredient in the developed dosage form.

**Aim.** Selection of the optimal gelling agent and development of the composition of a soft dosage form used for healing wounds of the skin and mucous membranes.

**Materials and methods.** Three model samples of gels made using potentially promising gelling agents were selected as objects of study: carbopol 940, sodium carboxymethyl cellulose, methyl cellulose. Rheological characteristics of the samples were studied by rotational viscometry on a Fungilab Premium viscometer (Spain) using a "cylinder in cylinder" measuring system. To study the biodegradation of the model sample, a FADT-1202A dissolution tester (FOCS Co., Ltd, China) equipped with a paddle stirrer was used. The degree of arginine release from the samples was estimated by the Kravchinsky equilibrium dialysis method.

**Results.** As a result of studying the structural and mechanical properties of the model samples, it was revealed that methylcellulose in combination with L-arginine allows creating a gel composition with the greatest stability. When studying the biodegradation of the methylcellulose-based composition, it was found that the gel is capable of being on the oral mucosa for no more than 60 minutes. Then, using the Kravchinsky equilibrium dialysis method during this period of time, the nature of the L-arginine release from the developed composition was established.

**Conclusion.** The conducted studies substantiated the choice of the wound-healing gel base. Based on the obtained results, methylcellulose was chosen as the optimal gelling agent for the production of a soft medicinal form with a wound-healing effect.

**Keywords:** wound healing gel, arginine, gelling agent, structural and mechanical properties, release

**For citation:** Rytchenkova V.Yu., Rytchenkov S.V., Stepanova E.F. et al. Development of the composition and characteristics of a wound-healing gel with L-arginine. *Rossiiskij bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2): 66–72. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-66-72>

## Введение

В настоящее время вопросы терапии ран кожи и слизистых оболочек проявляются все более отчетливо. Данные виды повреждений встречаются как в повседневной жизни, так и в условиях вооруженных конфликтов. Следовательно, использование ранозаживляющей терапии важно как при амбулаторном лечении, так и при оказании первой помощи.

Рынок ранозаживляющих лекарственных препаратов довольно многообразен и представлен в виде различных лекарственных форм — мазей, паст, аэрозолей, присыпок, пленок, гелей и растворов. Одной из наиболее современных и востребованных лекарственных форм среди них являются гели, поскольку их фармакологические и технологические преимущества неоспоримы. Прежде всего это отсутствие раздражающего действия, которое обеспечено структурно-механическими показателями самой лекарственной формы. В сравнении с другими лекарственными формами гели легко наносятся на поверхность слизистых оболочек и кожных покровов, обладают достойными тиксотропными и мукоадгезивными свойствами. Последнее свойство позволяет значительно пролонгировать действие лекарственного препарата [1]. Эти положительные качества создают возможность широкого диапазона использования ранозаживляющих и противовоспалительных средств,

в частности, применение их для лечения соответствующих заболеваний полости рта, в том числе таких, как стоматит и пародонтит [2]. В качестве основного действующего компонента в разрабатываемой лекарственной форме использовали L-аргинин, являющийся субстратом для синтаз оксида азота (II) (NO (II)), при участии которых в организме происходит образование NO. NO (II) — необходимый элемент процесса ранозаживления, поскольку он нормализует сосудистый тонус, восстанавливает функционирование эндотелия, оказывает антимикробное действие, при этом являясь сильнейшим вазодилататором. Благодаря способности быть донатором NO (II) для клеток эндотелия сосудов молекула L-аргинина проявляет множество терапевтических эффектов. Конечные продукты обмена аргинина, вырабатываемые ферментами аргиназой, декарбоксилазой аргинина и синтазой окиси азота, играют важную роль в заживлении ран, иммунной реакции, биологии опухолей и регулировании воспалительных процессов [3]. Таким образом, аргинин помогает в работе иммунной системы, полезен для восстановления после хирургических операций и травм, помогает при заживлении любых ран, в том числе и в ротовой полости.

В качестве гелевой основы, демонстрирующей достойные реологические и биофармацевтические характеристики, зарекомендовал себя карбопол [4, 5].

Известно, что гели на основе метилцеллюлозы (МЦ) и натрий-карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) совместимы с большинством лекарственных веществ, не обладают токсичностью и раздражающим действием. В научной литературе приведены результаты исследований, которые демонстрируют, что данные гелеобразователи обладают высокой степенью высвобождения действующих веществ, удовлетворительными структурно-механическими свойствами [6]. Применение гелей на основе производных МЦ также может способствовать сокращению времени ранозаживления [7].

При оценке степени высвобождения активных компонентов из гелевой композиции необходимо учитывать время удержания лекарственной формы на месте аппликации. Одним из способов изучения биодеградации является методика, описанная А.Г. Пальвинским и соавт., заключающаяся в распределении геля по полимерной пластинке, которая помещается в аппарат типа «Лопастная мешалка», где определялось время удержания исследуемой композиции [8]. На следующем этапе исследования необходимо определить количество лекарственного вещества, высвобождающегося в период удержания геля на месте нанесения. Для проведения данного испытания используется диализ через полупроницаемую мембрану по Кривчинскому [9, 10].

**Цели исследования** – выбор оптимального гелеобразователя и разработка состава мягкой лекарственной формы, применяемой для заживления ран кожных покровов и слизистых оболочек.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- провести исследования реологических характеристик модельных образцов гелевых композиций;
- определить время биодеградации выбранного состава;
- изучить степень высвобождения L-аргинина из геля в процессе биодеградации.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования представлены 3 модельных образца гелей, изготовленных с использованием потенциально перспективных гелеобразователей: карбопола 940 (UTS, Скандинавия), Na-КМЦ («ХимФарм продукт», Россия), МЦ («АМК-групп», Россия), представленных в исследованиях как образцы 1–3 соответственно. В качестве пластификатора во все исследуемые составы вводили глицерин в количестве 10 % от массы геля.

Реологические характеристики образцов изучали методом ротационной вискозиметрии на приборе Fungilab Premium (Испания) с использованием измерительной системы «цилиндр в цилиндре».

Регистрацию и накопление данных осуществляли посредством программы Fungilab Data Boss (version 1.0.16, Fungilab, Испания), дополнительную статистическую обработку данных и построение реограмм проводили с помощью программы Microsoft Excel 2016 (version 2407, Microsoft, США).

Исследуемые образцы гелей поочередно помещали в цилиндр ротационного вискозиметра. Исследования осуществляли в диапазоне скорости вращения шпинделя от 0,1 до 250,0 об/мин [11]. Показатели вязкости, скорости и напряжения сдвига измеряли каждый оборот шпинделя, общее время экспозиции образца в направлении увеличения скорости вращения, а затем ее уменьшения составило 40 мин.

Для изучения биодеградации модельного образца использовали тестер растворения FADT-1202A (FOCS Co., Ltd, Китай), снабженный лопастной мешалкой. Образец геля массой 1,0 г равномерно наносили на полупроницаемую поливинилхлоридную мембрану с размером пор 12–14 кДа, помещаемую в стакан тестера. Скорость вращения лопастной мешалки составляла 100 об/мин. Испытание проводили в среде калий-фосфатного буферного раствора pH 7,0 при температуре  $37,0 \pm 0,3$  °C. Биодеградацию оценивали визуально с помощью фотофиксации на камеру Canon EOS 2000D Kit 18–55 IS (Canon, Тайвань) [8].

Степень высвобождения аргинина из образцов оценивали методом равновесного диализа по Кривчинскому. Для проведения диализа использовали стеклянную трубку длиной 150 мм и диаметром 20 мм, на один конец которой крепили целлофановую пленку марки «Купрофан» толщиной 45 мкм, а также термостатируемый сосуд вместимостью 250 мл. На внутреннюю поверхность мембраны равномерным слоем наносили 1,5 г исследуемого образца геля, после чего мембрану неподвижно закрепляли на конце диализной трубки. После этого трубку вносили в термостатируемый стакан с диализной средой и погружали на глубину 0,5 мм. Диализной средой служила вода очищенная, объем которой составлял 40 мл. Диализ проводили в термостате при температуре  $37,0 \pm 1,0$  °C. Пробы диализатов (по 1 мл) отбирали через 15, 30, 45 и 60 мин. Объем восполняли таким же количеством диализной среды.

Содержание аргинина определяли, измеряя оптическую плотность отобранных проб после реакции с нингидрином. Отобранный объем помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 1 мл фосфатного буфера pH 6,8 и 3 мл 1 % спиртового раствора нингидрина, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане при температуре 100 °C в течение 30 мин. Затем растворы охлаждали до комнатной температуры и доводили водой очищенной до метки. Измеряли оптическую плотность полученного

раствора на спектрофотометре UV mini-1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны  $568 \pm 3$  нм.

### Приготовление раствора стандартного образца аргинина

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 0,05 г аргинина (точная навеска), растворяли в воде очищенной и доводили растворителем до метки. Затем 1 мл раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 1 мл фосфатного буфера pH 6,8 и 3 мл 1 % спиртового раствора нингидрина, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Охлаждали до комнатной температуры и доводили водой до метки.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре UV mini-1240 в максимуме поглощения при длине волны  $568 \pm 3$  нм.

### Приготовление раствора сравнения

Для приготовления раствора сравнения в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 1 мл воды очищенной, 1 мл фосфатного буфера, 3 мл 1 % спиртового раствора нингидрина, перемешивали и нагревали на водяной бане в течение 30 мин. Охлаждали и доводили водой до метки.

Раствор сравнения использовали для установления базовой линии непосредственно перед проведением анализа.

## Результаты и обсуждение

На I этапе исследования проведен анализ структурно-механических свойств изготовленных модельных образцов. По результатам изучения реологических характеристик гелей и статистической обработки полученных данных построены кривые течения исследуемых образцов, приведенные на рис. 1.

Из представленного рисунка видно, что реограммы течения модельных составов 1–3 отклоняются

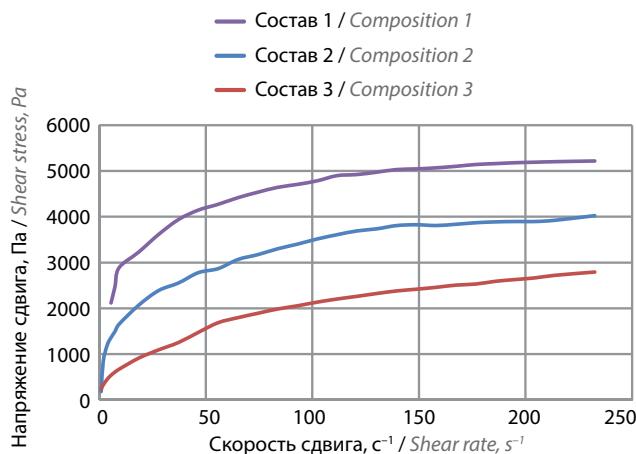


Рис. 1. Кривые течения модельных составов

Fig. 1. Flow curves of model compositions

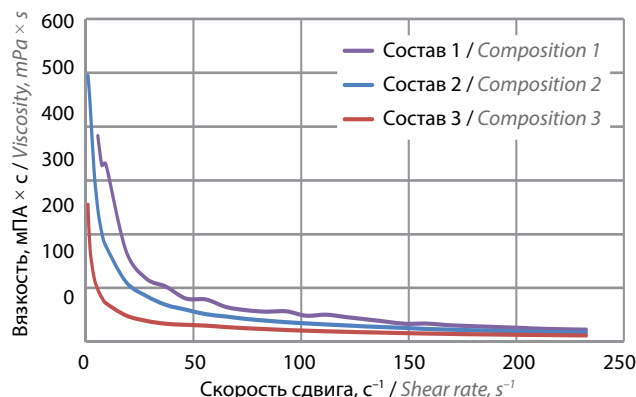


Рис. 2. Кривые вязкости модельных составов

Fig. 2. Viscosity curves of model compositions

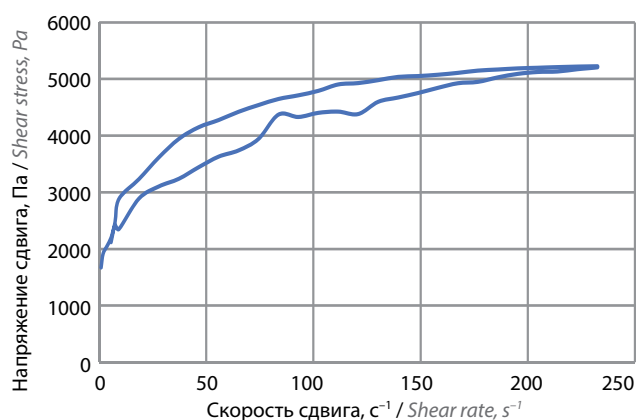


Рис. 3. Определение тиксотропных свойств состава 1 (температура 20 °С)

Fig. 3. Determination of thixotropic properties of composition 1 (temperature 20 °С)

от прямой линии и соответствуют реограммам не-ньютоновских жидкостей [12].

Далее проводили анализ кривых вязкости модельных составов (рис. 2).

Кривые наглядно демонстрируют различия в вязкости рассматриваемых образцов, при этом оптимальные значения вязкости наблюдают для состава, изготовленного на основе МЦ (3).

Для окончательного выбора оптимального гелеобразователя проводили определение тиксотропных свойств экспериментальных составов. Для этого изучили кривые течения (зависимость напряжения сдвига от скорости сдвига) (рис. 3–5).

По результатам определения петля гистерезиса гелевых композиций 1 и 2 по площади составляет более 90 % от общего достоверного интервала измерений для данных составов, что позволяет сделать вывод об их низкой стабильности и возможности расслоения при нагрузках. Состав 3 имеет петлю гистерезиса площадью менее 10 %, т.е. МЦ в сочетании с L-аргинином позволяет создать гелевую

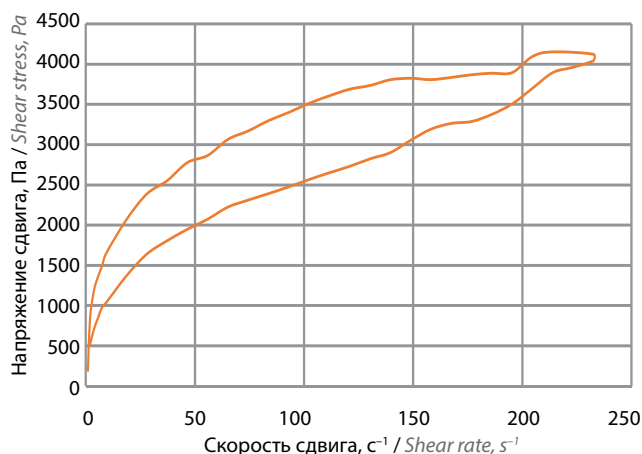


Рис. 4. Определение тиксотропных свойств состава 2 (температура 20 °C)

Fig. 4. Determination of thixotropic properties of composition 2 (temperature 20 °C)

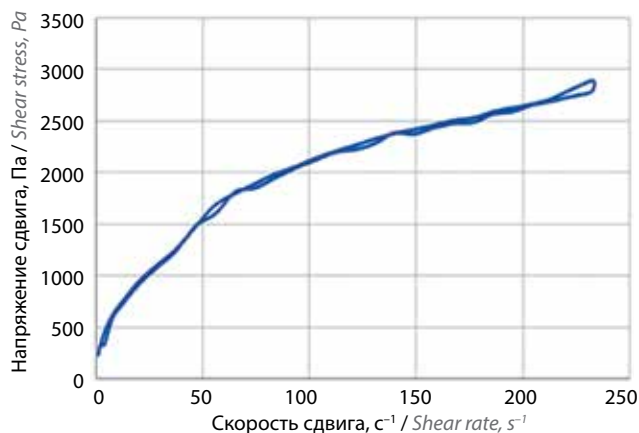


Рис. 5. Определение тиксотропных свойств состава 3 (температура 20 °C)

Fig. 5. Determination of thixotropic properties of composition 3 (temperature 20 °C)

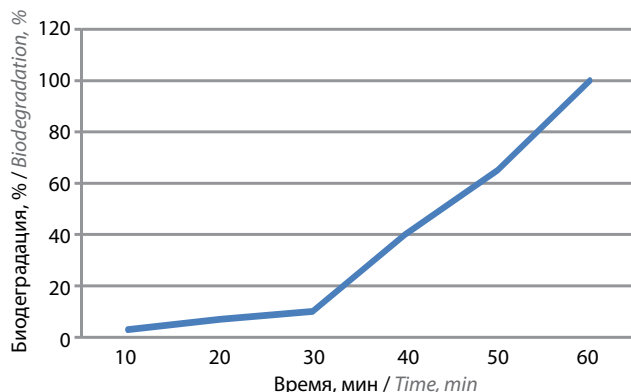


Рис. 6. Степень биодеградации геля на основе метилцеллюлозы в среде, имитирующей полость рта

Fig. 6. Degree of biodegradation of methylcellulose-based gel in an environment simulating the oral cavity

композицию, обладающую наибольшей стабильностью.

Исходя из результатов исследования структурно-механических свойств модельных образцов оптимальным оказался гель на основе МЦ, предполагаемый для использования в качестве ранозаживляющего средства. Гель обладает оптимальными показателями вязкости, достойными тиксотропными свойствами, а также демонстрирует высокую стабильность композиции. С данным составом были проведены дальнейшие исследования степени биодеградации и высвобождения действующих веществ.

Исследования степени биодеградации модельного образца в среде ротовой полости выявили, что в течение первых 30 мин эксперимента гель практически не подвергается визуальной деструкции и его объем визуально уменьшается не более чем на 10 % (рис. 6). В течение следующих 30 мин образец на мембране считали полностью растворившимся, поскольку визуально на мембране наблюдали менее 5 % от его изначального количества.

В результате определения биодеградации модельного образца в среде, имитирующей слюну, установили, что гель на основе МЦ способен находиться на слизистой оболочке полости рта не более 60 мин. Исходя из этого, при дальнейшем изучении степени высвобождения L-аргинина из геля по Кривчинскому учитывали показатели только 1-го часа исследования.

Количество высвободившегося аргинина, содержащегося в диализате ( $C$ , %), рассчитывали по формуле:

$$C\% = \frac{A_x \times V \times W_x \times a}{A_{\text{pco}} \times V_a \times a_x},$$

где  $A_x$  — оптическая плотность раствора диализата;  $V$  — общий объем диализата, мл;  $W_x$  — разведение, мл;  $A_{\text{pco}}$  — оптическая плотность раствора стандартного образца;  $V_a$  — объем диализата, взятый для анализа;  $a_x$  — количество аргинина в навеске геля, г;  $a$  — навеска стандартного образца аргинина (0,0005), г.

Результаты исследования степени высвобождения аргинина представлены в табл. 1.

На основании данных измерения концентрации аргинина, перешедшего в диализат на протяжении периода наблюдения, построена кривая высвобождения, представленная на рис. 7.

На приведенном графике можно отследить характер высвобождения в указанных условиях и в данный момент за 60 мин, в течение которых лекарственная форма может находиться на слизистой оболочке. Рисунок демонстрирует, что в первые 30 мин эксперимента гель высвобождает наибольшее количество аргинина за весь период исследования. В последующие 30 мин

**Таблица 1.** Изменение концентрации аргинина в диализате при исследовании степени высвобождения

Table 1. Change in arginine concentration in dialysate during release rate study

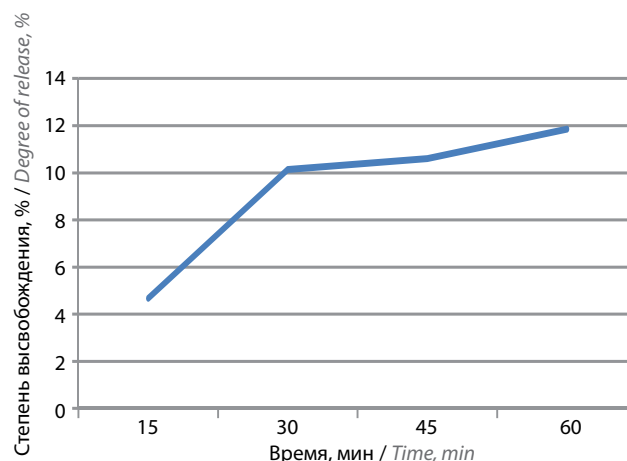
Время, мин Time, min	$A_x$	C, %
15	0,03	4,678
30	0,065	10,137
45	0,068	10,604
60	0,076	11,852

аргинин высвобождался практически равномерно в небольших количествах.

Таким образом, ранозаживляющий гель на основе МЦ обладает оптимальными структурно-механическими свойствами и обеспечивает равномерное высвобождение L-аргинина.

### Закключение

В ходе проведенных исследований обоснован выбор главного действующего компонента ранозаживляющего геля. Проведены исследования реологических характеристик модельных образцов гелей, которые продемонстрировали, что наилучшими свойствами обладает гель на основе МЦ. Выявлено также,



**Рис. 7.** Кривая высвобождения аргинина из геля

Fig. 7. Arginine release curve from gel

что время биodeградации предлагаемого состава в среде, имитирующей слюну, составляет 60 мин. В течение этого времени была изучена степень высвобождения L-аргинина. Обнаружено, что в первые 30 мин гель высвобождает наибольшее за весь период исследования количество аргинина. Во 2-й половине эксперимента аргинин высвобождался в небольших количествах практически равномерно. Выбранный состав имеет достойные потребительские характеристики – удобство нанесения и удовлетворительные органолептические свойства.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Дуданов И.П., Виноградов В.В., Криштоп В.В. Преимущества и недостатки гелевых покрытий в терапии ожоговых ран и ожогов (обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий 2022;2:13–22. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-2-1-2  
Dudanov I.P., Vinogradov V.V., Kristop V.V. Advantages and disadvantages of gel coatings in the treatment of burn wounds and burns (literature review). Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Bulletin of New Medical Technologies 2022;2:13–22. (In Russ.). DOI: 10.24412/2075-4094-2022-2-1-2
- Кравченко Р.В., Ржеусский С.Э. Разработка состава и технологии стоматологического антисептического геля на основе комбинации тетраметилendiэтилентетрамина и полигексаметиленгуанидина гидрохлорида. Вестник фармации 2023;3(101):58–65. DOI: 10.52540/2074-9457.2023.3.58  
Kravchenko R.V., Rzheussky S.E. Development of the composition and technology of dental antiseptic gel based on a combination of tetramethylene diethylenetetramine and polyhexamethylene guanidine hydrochloride. Vestnik farmatsii = Bulletin of Pharmacy 2023;3(101):58–65. (In Russ.). DOI: 10.52540/2074-9457.2023.3.58
- Marini J.C., Agarwal U., Didelija I.C. Dietary arginine requirements for growth are dependent on the rate of citrulline production in mice. J Nutr 2015;145:1227–31. DOI: 10.3945/jn.114.209668
- Степанова Э.Ф., Ковтун Е.В., Бунятян Н.Д. и др. Изучение и подбор оптимальных реологических характеристик гелевых композиций пирacetам для интраназального применения. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):78–85. DOI: 10.17650/1726-9784-2024-23-3-78-85  
Stepanova E.F., Kovtun E.V., Bunyatyan N.D. et al. Study and selection of optimal rheological characteristics of piracetam gel compositions for intranasal use. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):78–85. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2024-23-3-78-85
- Глизова Т.М., Погребняк Л.В. Теоретическое обоснование, разработка состава и изучение противовоспалительной активности гелей с CO<sub>2</sub>-экстрактом *Abies sibirica*. Пульс 2022;24(6):29–34. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-6-29-33  
Glizhova T.M., Pogrebnyak L.V. Justification théorique, développement de la composition et étude de l'activité anti-inflammatoire des gels avec extrait de CO<sub>2</sub> *Abies sibirica*. Pulse 2022;24(6):29–34. (In Russ.). DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-6-29-33
- Соповская А.В., Сампиев А.М., Никифорова Е.Б. Актуальные вопросы номенклатуры, состава и технологии стоматологических гелей. Современные проблемы науки и образования 2015;1:1858. DOI: 10.17513/spno.2015.1

- Sapovskaya A.V., Sampiev A.M., Nikiforova E.B. Topical issues of nomenclature, composition and technology of dental gels. *Sovremennye problemy nauki y obrazovaniya* = Modern Problems of Science and Education 2015;1:1858. (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.2015.1
7. Лебедева С.А., Галенко-Ярошевский (мл.) П.А., Мельник С.И. и др. Оценка ранозаживляющего действия металлокомплекса цинка производного N-изопропенили-мидазола на модели линейной кожной раны у крыс. *Фармация* 2021;70(6):49–55. DOI: 10.29296/25419218-2021-06-09
  - Lebedeva S.A., Galenko-Yaroshevsky (Jr) P.A., Melnik S.I. et al. Evaluation of the wound healing effect of the zinc metal complex of the N-isopropenylimidazole derivative on a linear skin wound model in rats. *Farmatsiya* = Pharmacy 2021;70(6):49–55. (In Russ.). DOI: 10.29296/25419218-2021-06-09
  8. Пальвинский А.Г., Бахрушина Е.О., Холина П.А. Биофармацевтическое изучение стоматологического геля берберина бисульфата. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2022;25(3):10–4. DOI: 10.29296/25877313-2022-03-02
  - Palvinsky A.G., Bakhrushina E.O., Kholina P.A. Biopharmaceutical study of berberine bisulfate dental gel. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* = Issues of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2022;25(3): 10–4. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2022-03-02
  9. Загорюлько Е.Ю., Караваяева А.С. Подходы к выбору вспомогательных веществ для геля стоматологического с цетилпиридиния хлоридом. *Фармация и фармакология* 2021;9(1):54–63. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-54-63
  - Zagorulko E.Y., Karavaeva A.S. Approaches to the selection of excipients for dental gel with cetylpyridinium chloride. *Farmatsiya i farmakologiya* = Pharmacy and Pharmacology 2021;9(1):54–63. (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-54-63
  10. Ярковой М.А., Струсовская О.Г. Разработка состава и технологии фотосенсибилизирующего геля на основе экстракта из каллусной ткани *Psoralea corylifolia*. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии* 2022;21(3):163–9. DOI: 10.37903/vsgma.2022.2.21
  - Yarkovoy M.A., Strusovskaya O.G. Development of the composition and technology of a photosensitizing gel based on an extract from *Psoralea corylifolia* callus tissue. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii* = Bulletin of the Smolensk State Medical Academy 2022;21(3):163–9. (In Russ.). DOI: 10.37903/vsgma.2022.2.21
  11. Кищенко В.М., Степанова Э.Ф., Верниковский В.В., Привалов И.М. Структурно-механические свойства защитной пленки с алоэ экстрактом жидким и актовегином. *Фармация* 2018;67(6):30–4. DOI: 10.29296/25419218-2018-06-06
  - Kishchenko V.M., Stepanova E.F., Vernikovskiy V.V., Privalov I.M. Structural and mechanical properties of a protective film with liquid aloe extract and actovegin. *Farmatsiya* = Pharmacy 2018;67(6):30–4. (In Russ.). DOI: 10.29296/25419218-2018-06-06
  12. Ковтун Е.В. Исследование влияния структурно-механических показателей гелеобразователя хитозана на технологию мягких лекарственных форм, содержащих экстракт гинкго билоба. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2022;25(5):46–51. DOI: 10.29296/25877313-2022-05-07
  - Kovtun E.V. Study of the influence of structural and mechanical properties of the gelling agent chitosan on the technology of soft dosage forms containing ginkgo biloba extract. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy y farmatsevticheskoy khimii* = Issues of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2022; 25(5):46–51. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2022-05-07

#### Вклад авторов

В.Ю. Рытченкова: разработка состава и технологии мягкой лекарственной формы, написание текста рукописи;  
С.В. Рытченков: разработка дизайна исследования, определение степени биодegradации геля;  
Э.Ф. Степанова: анализ структурно-механических свойств исследуемых образцов;  
Д.С. Юдин: определение степени высвобождения L-аргинина из лекарственной формы;  
С.В. Поройский: обзор источников литературы по изложенной теме, обработка и анализ полученных результатов.

#### Author's contributions

V.Yu. Rytchenkova: development of the composition and technology of the soft dosage form, writing the manuscript;  
S.V. Rytchenkov: development of the study design, determination of the degree of biodegradation of the gel;  
E.F. Stepanova: analysis of the structural and mechanical properties of the studied samples;  
D.S. Yudin: determination of the degree of L-arginine release from the dosage form;  
S.V. Poroyskiy: review of literary sources on the topic, processing and analysis of the results obtained.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

В.Ю. Рытченкова / V.Yu. Rytchenkova: <https://orcid.org/0009-0005-0784-9685>  
С.В. Рытченков / S.V. Rytchenkov: <https://orcid.org/0009-0005-7597-4138>  
Э.Ф. Степанова / E.F. Stepanova: <https://orcid.org/0000-0002-4082-3330>  
Д.С. Юдин / D.S. Yudin: <https://orcid.org/0009-0006-0776-1736>  
С.В. Поройский / S.V. Poroyskiy: <https://orcid.org/0000-0001-6990-6482>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Funding.** The work was performed without external funding.

**Статья поступила:** 04.12.2024. **Принята к публикации:** 13.05.2025. **Опубликована онлайн:** 27.06.2025.

**Article submitted:** 04.12.2024. **Accepted for publication:** 13.05.2025. **Published online:** 27.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-73-82>

# Разработка и валидация биоаналитической методики определения ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Д.А. Козин, Н.Ю. Кульбачевская, В.А. Балыков, З.С. Шпрах

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

**Контакты:** Дмитрий Андреевич Козин [kozin1993@inbox.ru](mailto:kozin1993@inbox.ru)

**Введение.** Синтезированное в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина гликозилированное производное индоло-[2,3-а]карбазола ЛХС-1269 – интеркалятора дезоксирибонуклеиновой кислоты и ремодулятора хроматина – представляет большой интерес для терапии злокачественных новообразований. Для проведения фармакокинетических исследований лекарственных форм ЛХС-1269 *in vivo* необходимо разработать методику определения ЛХС-1269 в биологических образцах.

**Цель исследования** – разработка и валидация биоаналитической методики с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) для фармакокинетических исследований ЛХС-1269.

**Материалы и методы.** В исследовании использовали субстанцию ЛХС-1269 с содержанием действующего вещества 99,4 %, плазму крови и печень здоровых иммунокомпетентных лабораторных самок мышей-гибридов (C<sub>57</sub>BL/6J×DBA2)F<sub>1</sub> разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Для подготовки биологических образцов применяли ацетонитрил и хлорид натрия. Определение проводили методом ВЭЖХ-УФ в обращенно-фазовом варианте в градиентном режиме. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в программе Microsoft Office Excel 2010.

**Результаты.** Для подготовки образцов плазмы крови разработана методика на основе депротеинизации охлажденным ацетонитрилом; подготовку образцов печени проводили с использованием комбинированной депротеинизации охлажденным ацетонитрилом и хлоридом натрия. Валидация разработанной методики подтвердила ее специфичность, линейность ( $r > 0,99$ ), правильность (отклик  $> 80$  % на малых концентрациях) и прецизионность (относительное стандартное отклонение  $\leq 3,5$  %) во всем аналитическом диапазоне; показано отсутствие эффекта переноса ЛХС-1269. Установлено, что образцы для анализа стабильны в течение 24 ч при комнатной температуре, а модельные смеси – в течение 1 мес при температуре не выше  $-18$  °С.

**Заключение.** Разработана биоаналитическая методика для количественного определения ЛХС-1269 в плазме крови и печени животных с применением метода ВЭЖХ-УФ, соответствующая требованиям к валидации методик для анализа биологических образцов Евразийского экономического союза.

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, фармакокинетика, пробоподготовка, депротеинизация, валидация

**Для цитирования:** Козин Д.А., Кульбачевская Н.Ю., Балыков В.А., Шпрах З.С. Разработка и валидация биоаналитической методики определения ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):73–82.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-73-82>

## Development and validation of bioanalytical technique for the LCS-1269 assay by high-performance liquid chromatography

Dmitry A. Kozin, Natalya Yu. Kulbachevskaya, Vitaly A. Balykov, Zoya S. Shprakh

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

**Contacts:** Dmitry Andreevich Kozin [kozin1993@inbox.ru](mailto:kozin1993@inbox.ru)

**Background.** The glycosylated derivative of indolo[2,3-a]carbazole LCS-1269, an DNA intercalator and a chromatin remodulator, synthesized in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (N.N. Blokhin NMRCO), is of great interest for the treatment of malignant tumors. To carry out pharmacokinetic studies of LCS-1269 dosage forms *in vivo*, it is necessary to develop a method for LCS-1269 assay in biological samples.

**Aim.** To develop and validate an analytical technique using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for LCS-1269 pharmacokinetic studies.

**Materials and methods.** The study used the LCS-1269 substance containing 99.4 % of the active component, blood plasma and liver of healthy cyclic immunocompetent laboratory mice hybrid (C<sub>57</sub>BL/6J×DBA2) F<sub>1</sub> of N.N. Blokhin NMRCO breeding. Acetonitrile and sodium chloride were used to prepare biological samples. Reversed-phase HPLC-UV method in the gradient regimen was used for LCS-1269 assay. Statistical processing of the obtained results was carried out in Microsoft Office Excel 2010 software.

**Results.** The technique based on cooled acetonitrile deproteinization was developed for blood plasma sample preparation; liver samples were prepared using combined cooled acetonitrile and sodium chloride deproteinization. The developed technique validation confirmed its specificity, linearity ( $r > 0.99$ ), correctness (response  $> 80$  % at low concentrations) and precision (relative standard deviation  $< 3.5$  %) in the entire analytical range; LCS-1269 transfer effect wasn't observed. It was found that the analyzed samples are stable for 24 hours at room temperature, and the model mixtures are stable during a month when stored at temperatures less than  $-18$  °C.

**Conclusion.** A bioanalytical technique for LCS-1269 assay in the blood plasma and liver of animals using HPLC-UV has been developed. Has been shown that the technique meets the requirements of the Eurasian Economic Union for the validation of biological samples analysis.

**Keywords:** high performance liquid chromatography, pharmacokinetics, sample preparation, deproteinization, validation

**For citation:** Kozin D.A., Kulbachevskaya N.Yu., Balykov V.A., Shprakh Z.S. Development and validation of bioanalytical technique for the LCS-1269 assay by high-performance liquid chromatography. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):73–82. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-73-82>

## Введение

Среди многочисленных биологически активных веществ природного и синтетического происхождения с подтвержденной противоопухолевой активностью большой интерес вызывает группа гликозилированных производных индолюкарбазола. Отличительной особенностью данной группы соединений является их способность взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и тем самым вызывать различные пути гибели опухолевых клеток. Это позволяет расширить диапазон противоопухолевого действия производных индолюкарбазола и влияет на избирательность (специфичность) воздействия, исключая или отсрочивая возникновение устойчивости опухоли к проводимому лечению [1, 2].

Синтезированное в лаборатории химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина производное индолю[2,3-а]карбазола ЛХС-1269 (*N*-[12-(1-β-D-ксилопиранозил)индолю-2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамид [3] (рис. 1) эффективно влияет на васкулогенную мимикрию, подавляет механизм ангиогенеза, связанный с фактором роста эндотелия сосудов, приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли [4]. Кроме того, ЛХС-1269 вызывает изменение экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз,

клеточное старение, способствуя регуляции метаболизма в условиях гипоксии, ответу на повреждение ДНК и активации ее репарации [5]. На культуре клеток HeLa обнаружено влияние ЛХС-1269 на метилирование ДНК, локализацию гистона H1, ремоделирование хроматина и реактивацию эпигенетически молчащих генов [6]. В исследовании [7] описана методика количественного определения действующего вещества методом высокoeffективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием, разработанная для стандартизации и контроля качества ЛХС-1269.

**Цель данной работы** — разработка и валидация биоаналитической методики с применением метода ВЭЖХ-УФ для фармакокинетических исследований ЛХС-1269.

## Материалы и методы

Отбор и транспортировку крови проводили в пробирках Vacuette объемом 2 мл, содержащих в качестве антикоагулянта дикалиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Greiner Bio-One, Австрия). Для пробоподготовки биологических образцов использовали стеклянные гомогенизаторы Поттера–Эльвейма с электрическим приводом, Glas-Col (США), вортекс (Heidolph ReaxTop, Германия), центрифужные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 и 2 мл

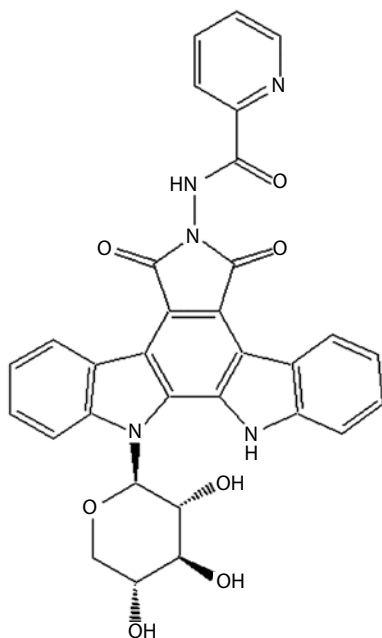


Рис. 1. ЛХС-1269

Fig. 1. LCS-1269

(«МиниМед», Россия) и центрифуги Eppendorf 5415R (Eppendorf, Германия) и Hettich Rotanta 460R (Hettich, Германия).

Содержание ЛХС-1269 определяли методом ВЭЖХ на аналитическом жидкостном хроматографе Agilent 1200 (Agilent, США) с диодно-матричным детектором, оснащенный предколонкой с защитным картриджем C18 4 × 3 мм (Phenomenex, США) и аналитической колонкой Zorbax SB C18, 50,0 × 4,6 мм, 1,8 мкм (Agilent, США). Для приготовления подвижной фазы и подготовки проб использовали ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Merck, Германия), деионизированную воду (18,2 МОм «АкваЛаб S18+ (Supreme)», «АкваЛаб», Россия) и хлорид натрия чистый для анализа («Химмед», Россия). Жидкие образцы отбирали автоматическими одноканальными дозаторами переменного объема Gilson Pipetman и Microman (Gilson, Франция). Для приготовления стандартных растворов использовали лабораторную мерную стеклянную посуду (ГОСТ 29227–91). Реактивы и биологические образцы взвешивали на аналитических весах Sartorius R200D 1-го класса точности и Sartorius L420S 2-го класса точности (Sartorius, Германия). Статистическую обработку полученных результатов

проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США).

Образцы крови и печени для приготовления модельных смесей брали у половозрелых иммунокомпетентных самок мышей-гибридов (C<sub>57</sub>Bl/6J×DBA2)F<sub>1</sub> возрастом 10 нед массой 20–22 г, полученных из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Работу с животными проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств<sup>1</sup>. Эвтаназию проводили путем дислокации шейных позвонков с последующим полным обескровливанием.

Образцы крови помещали в пробирки с антикоагулянтом, центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения ротора 3500 об/мин при комнатной температуре и отбирали плазму. Печень извлекали сверху вниз с осушением на подложке (при необходимости). Образцы плазмы крови и печени переносили в предварительно пронумерованные криопробирки (Wuxi NEST Biotechnology, КНР), которые герметично укупоривали и помещали на хранение в низкотемпературную морозильную камеру МНТ-80 (Россия) при температуре –80 °С. Перед приготовлением модельных смесей образцы размораживали не более 2 ч при температуре не выше 6 °С.

В качестве стандартного образца использовали субстанцию ЛХС-1269, полученную в лаборатории химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, содержащую 99,4 % действующего вещества (величина определена методом вычитания примесей из 100 %).

Для разработки и валидации биоаналитической методики готовили модельные смеси, прибавляя растворы стандартного образца ЛХС-1269 известной концентрации к образцам плазмы крови или гомогенизата печени. На основании ранее проведенных исследований в качестве аналитического выбран диапазон концентраций от 0,5 до 150,0 мкг/мл плазмы крови и от 0,5 до 150,0 мкг/г печени [7].

Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с Приложением 6 Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов)<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 №81 (ред. от 12.04.2024). URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026101?ysclid=mbhuoqzbn9774626223>

<sup>2</sup>Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Приложение 6. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 12.04.2024). URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026107?ysclid=mbhnuvld4n756166354>

### Результаты и обсуждение

Хроматографические условия, указанные в табл. 1, выбраны на основании проведенных ранее исследований по разработке методики количественного определения ЛХС-1269 в субстанции и лекарственной форме [7, 8].

**Таблица 1.** Хроматографические условия определения ЛХС-1269

**Table 1.** Chromatographic conditions of LCS-1269 assay

Параметр Parameter	Показатель Score	
Подвижная фаза А Mobile phase A	Вода Water	
Подвижная фаза Б Mobile phase B	9:1 ацетонитрил: вода, по объему 9:1 acetonitrile: water, by volume	
Градиент Gradient		
Время, мин Time, min	А, % A, %	Б, % B, %
0,0	55	45
4,0	27,5	72,5
4,2	0	100
5,0	Остановка Stopping	
Время после, мин Posttime, min	3	
Объем вводимой пробы, мкл Sample volume, µl	10 – для плазмы крови 10 for blood plasma; 5 – для печени 5 for liver	
Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	0,7	
Температура автосампле- ра, °С Autosampler temperature, °C	7	
Температура колонки, °С Column temperature, °C	40	
Длина волны детектора, нм Detector wavelength, nm	315 ± 4	

Для сокращения расхода растворителя и продолжительности анализа для разработки биоаналитической методики выбрали колонку с геометрическими параметрами 50 × 4,6 мм, наполненную сорбентом с размером частиц 1,8 мкм. Поскольку методика предназначена для анализа большого количества биопроб в рамках изучения доклинической фармакокинетики, для хроматографирования использовали градиентный режим, включающий линейное изме-

нение содержания элюента Б (прежде всего ацетонитрила). Градиентный режим, соотношение подвижных фаз на старте и плато 100 % подвижной фазы Б на финише (4,2–5,0 мин) обусловлены сложным составом анализируемых биологических образцов. Режим элюирования подобрали таким образом, чтобы время удерживания (RT) ЛХС-1269 находилось в интервале от 3 до 4 мин, а общее время анализа не превышало 5,5 мин (в использованных хроматографических условиях RT ЛХС-1269 составило примерно 3,5 мин) (рис. 2). Длина волны детектирования (315 ± 4 нм) выбрана в соответствии с положением аналитического максимума поглощения целевого аналита [8].

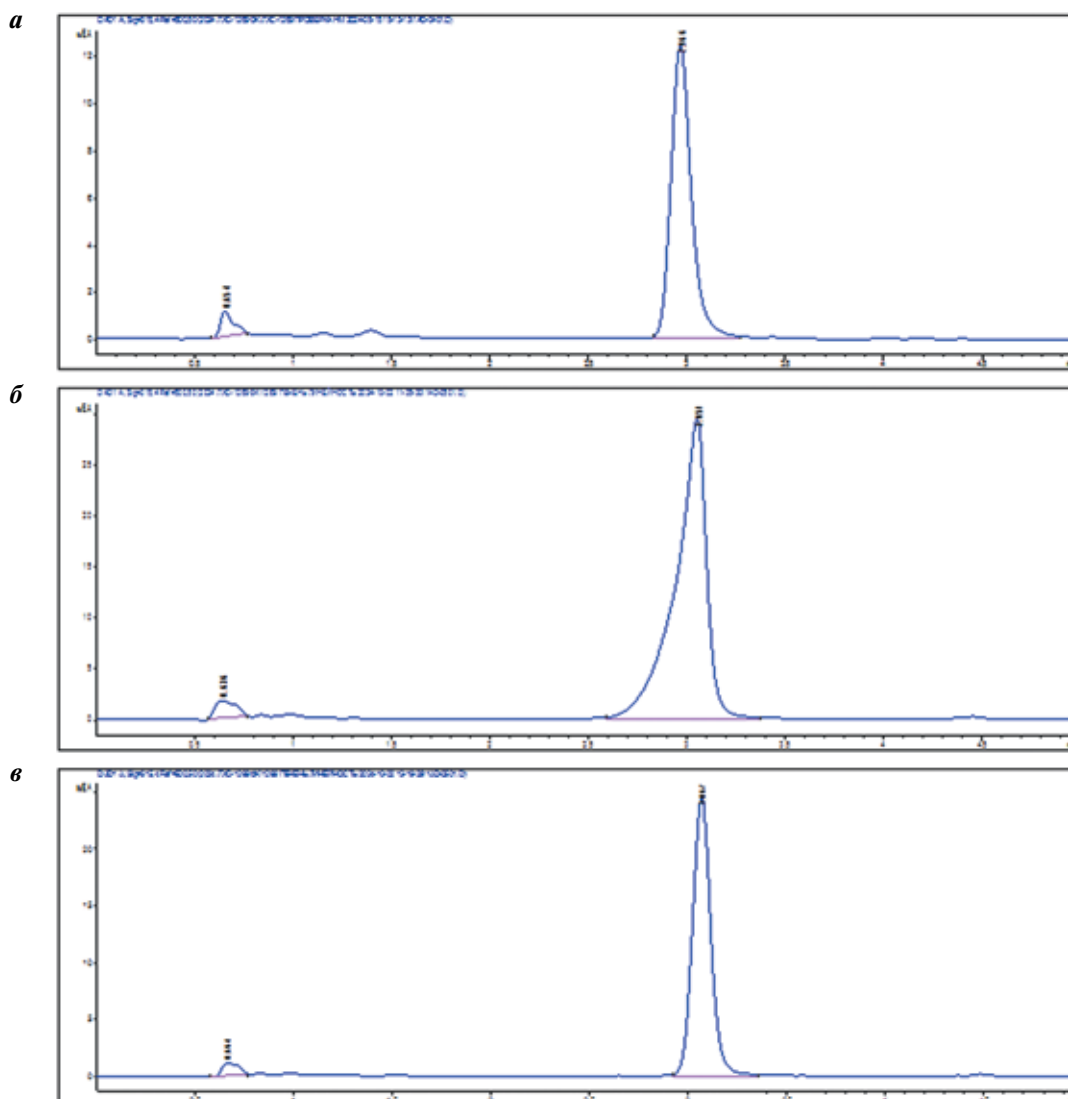
При введении 10 мкл образцов плазмы крови на хроматограммах получали пик ЛХС-1269 с фактором симметрии примерно 1,1 (см. рис. 2, а). При введении такого же объема образцов печени пик аналита имел уширенную и несимметричную форму с фактором асимметрии более 1,5 (см. рис. 2, б). Для получения симметричных пиков аналита объем вводимой пробы образцов печени уменьшили в 2 раза — до 5 мкл (см. рис. 2, в). Параллельно хроматографировали холостые образцы (рис. 3).

Одним из основных этапов разработки аналитических методик для таких сложных комплексных матриц, как плазма крови и печень, является выбор оптимального способа подготовки анализируемых образцов [9].

В основу методики выделения ЛХС-1269 из плазмы крови положен простой, универсальный и достаточно эффективный способ депротеинизации охлажденным ацетонитрилом, использованный ранее при фармакокинетических исследованиях гликозидного производного индолакарбазола ЛХС-1208. Выделение ЛХС-1269 проводили после гомогенизации образца с последующим осаждением белков охлажденным ацетонитрилом и дополнительным высаливанием хлоридом натрия [5, 9].

Для приготовления модельных смесей к рассчитанному объему плазмы крови прибавляли растворы ЛХС-1269 с концентрацией 1000, 100 и 10 мкг/мл до общего объема модельной смеси 200 мкл. Для выделения ЛХС-1269 из модельной смеси ко всему объему прибавляли 800 мкл охлажденного до –18 °С ацетонитрила, пренебрегая величиной коэффициента объемного термического расширения ацетонитрила ввиду ее ничтожности. Перемешивали в течение 2 мин на вортексе и центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения ротора 3500 об/мин и температуре 0 °С. После центрифугирования образцы выдерживали в течение 8 ч при температуре 4 °С, супернатант отделяли и использовали для анализа.

К навеске образца печени прибавляли 200 мг прибавляли 400 мкл деионизированной воды



**Рис. 2.** Хроматограммы биологических образцов, содержащих 10 мкг ЛХС-1269: а — плазма крови; б — печень (объем введения — 10 мкл); в — печень (объем введения — 5 мкл)

**Fig. 2.** Chromatogram of biological samples, including 10 µg LCS-1269: а — blood plasma; б — liver (injection volume — 10 µl); в — liver (injection volume — 5 µl)

и гомогенизировали на ледяной бане до получения однородной массы. Для приготовления модельной смеси к 400 мкл гомогенизата в центрифужной пробирке прибавляли рассчитанный объем раствора стандартного образца ЛХС-1269 с концентрацией 1000, 100 и 10 мкг/мл, а затем — 300 мкл охлажденного ацетонитрила и 400 мг хлорида натрия. Смесь перемешивали в течение 1 мин на вортексе, прибавляли еще 300 мкл охлажденного ацетонитрила, снова интенсивно перемешивали на вортексе в течение 2 мин, центрифугировали 10 мин при скорости 3500 об/мин и температуре 5 °С и выдерживали в течение 8 ч при температуре 4 °С. Супернатант отделяли и использовали для анализа.

Валидацию биоаналитической методики проводили по следующим параметрам: селективность, эффект

переноса пробы, калибровочная кривая (линейность), нижний предел количественного определения (НПКО), прецизионность, правильность и стабильность.

Селективность разработанной методики определяли при сравнении хроматограмм модельных смесей, содержащих ЛХС-1269 (см. рис. 2, а, в), и холостых образцов плазмы крови и печени. Испытание показало отсутствие влияния содержащихся в пробах веществ на площадь пика ЛХС-1269 (см. рис. 3). Стандартное отклонение (SD) между значениями RT для 6 введений не превышало 0,011, а для площади пика — 2,83. Разрешение между пиком ЛХС-1269 и пиком с RT приблизительно 0,64 мин составило более 3, а симметрия пика не превышала 1,5. Метрологические характеристики воспроизводимости RT и площади пика ЛХС-1269 приведены в табл. 2.

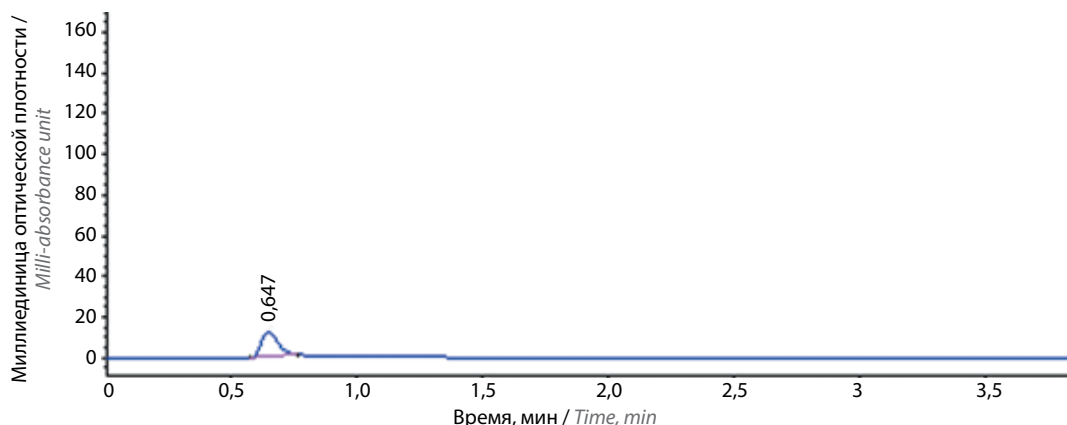


Рис. 3. Холостой образец плазмы крови

Fig. 3. Blank blood plasma sample

Таблица 2. Метрологические характеристики отклонения времени удерживания и площади пика

Table 2. Metrological characteristics of retention time and peak area deviations

Образец Sample	Время удерживания Retention time	Среднее значение Average value	Стандартное отклонение Standard deviation	Площадь пика Peak area	Среднее значение Average value	Стандартное отклонение Standard deviation
Плазма крови Blood plasma						
1	2,973	2,979	0,011	1105,4	1104,6	2,83
2	2,964			1100,5		
3	2,972			1103,3		
4	2,984			1108,7		
5	2,993			1103,5		
6	2,987			1106,3		
Печень Liver						
1	3,013	3,037	0,016	1548,4	1547,5	2,69
2	3,052			1543,8		
3	3,037			1551,5		
4	3,074			1547,9		
5	3,020			1545,2		
6	3,026			1548,0		

Эффект переноса оценивали в соответствии с «Требованиями к валидации...» при последовательном шестикратном введении холостых образцов плазмы крови или печени после анализа образцов с концентрацией, соответствующей верхнему уровню количественного определения. На хроматограммах холостых образцов отсутствовали пики, по RT соответствующие ЛХС-1269, т.е. перенос сигнала от определяемого вещества в холостой образец отсутствует.

Линейность методики подтверждали графически, анализируя зависимость между площадью пика ЛХС-1269 на хроматограммах модельных смесей и его расчетной концентрацией в анализируемом образце (рис. 4) в диапазоне от 0,5 до 150,0 мкг/мл для плазмы крови и от 0,5 до 150,0 мкг/г для печени.

На основе полученных данных рассчитали коэффициенты корреляции ( $r$ ) и значения НПКО (табл. 3). Значения коэффициентов корреляции выше 0,99

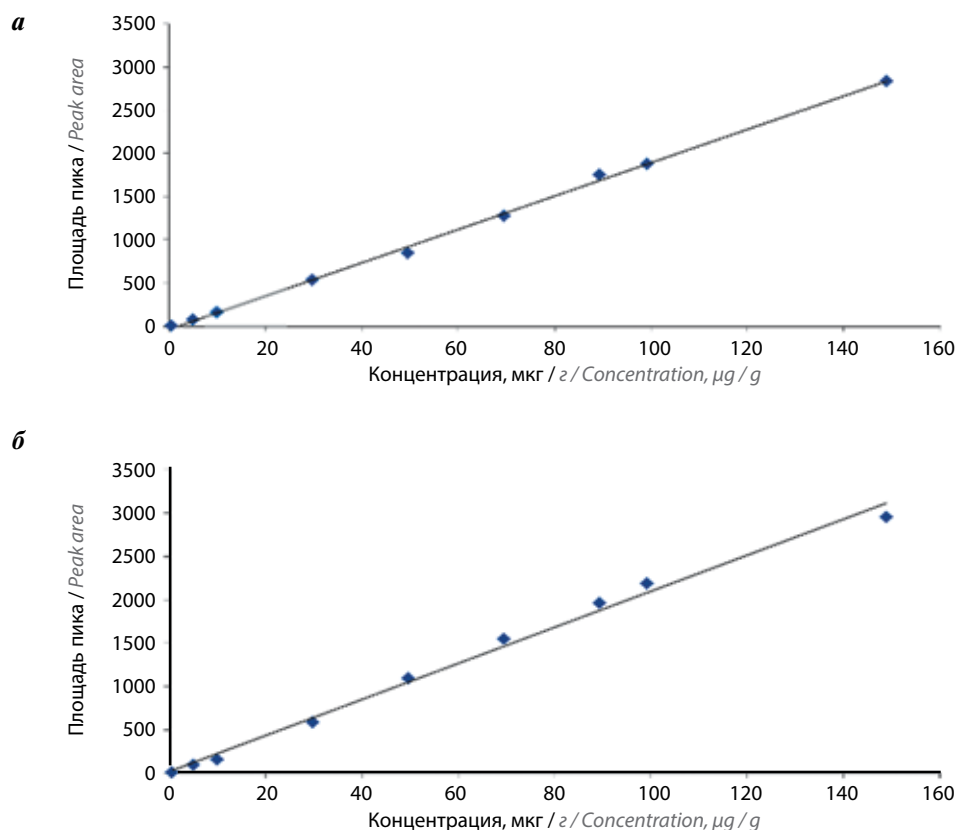


Рис. 4. Зависимость площади пика ЛХС-1269 от его концентрации в образцах плазмы крови (а) и печени (б)

Fig. 4. Dependence of LCS-1269 peak area on its concentration in samples of blood plasma (a) and liver (b)

Таблица 3. Параметры линейной зависимости разработанной методики

Table 3. Parameters of the linear dependence of the developed method

Образец Sample	Уравнение линейной зависимости Linear relationship equation	$r$	Нижний предел количественного определения Limit of quantitation
Плазма крови Blood plasma	$y = 19,27x - 33,83$	0,9984	0,13 мкг/мл 0.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Печень Liver	$y = 20,82x + 16,49$	0,9931	0,31 мкг/г 0.31 $\mu\text{g}/\text{g}$

указывают на высокую степень соответствия зависимости между величиной аналитического сигнала и содержанием аналита в образце.

В соответствии с «Требованиями к валидации...» оценили прецизионность и правильность разработанной методики. Для этого определили содержание ЛХС-1269 в 5 образцах плазмы крови/печени на каждом из 4 уровней концентрации (НПКО, нижний, средний и не менее 75 % от максимальной). Для каждого уровня определили значения коэффициента вариации и отклика при пересчете по уравнению линейной зависимости. Результаты представлены в табл. 4.

Полученные значения коэффициента вариации указывают на небольшую изменчивость вариацион-

ного ряда: ошибка отклика при пересчете по уравнению линейной зависимости не превышала 15 % для всех уровней, в том числе для НПКО.

Оценку стабильности ЛХС-1269 в анализируемых растворах (после пробоподготовки) и в модельных смесях проводили для нижнего, среднего и верхнего уровней концентраций. Показано, что площадь пика ЛХС-1269 на хроматограммах анализируемых растворов остается неизменной в течение 1 дня хранения при комнатной температуре и уменьшается более чем на 15–20 % от начального значения при хранении в течение 5 дней в холодильной камере при температуре 4 °С. Установлено, что хранение модельных смесей в течение 1 мес при температуре не выше –18 °С

Таблица 4. Результаты испытания методики на прецизионность и правильность  
Table 4. The results of the Precision and the Accuracy tests

Плазма крови Blood plasma						Печень Liver					
ЛХС-1269, мкг/мл LCS-1269, µg/ml						ЛХС-1269 мкг/г LCS-1269 µg/g					
Введено Introduce	Найдено Found	Среднее значение Average value	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %	Отклик, % Response, %	Введено Introduce	Найдено Found	Среднее значение Average value	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %	Отклик, % Response, %		
0,5	0,39	0,40	3,3	80,0	0,50	0,43	0,44	3,5	88,0		
	0,39					0,47					
	0,39					0,44					
	0,40					0,44					
	0,42					0,44					
29,78	27,30	27,08	2,1	90,9	29,78	27,88	28,09	0,8	94,3		
	27,60					28,24					
	27,06					28,25					
	26,13					28,26					
	27,32					27,83					
69,48	65,25	64,34	2,5	92,6	69,48	73,43	74,19	0,8	106,8		
	66,11					74,66					
	62,58					74,76					
	62,63					74,47					
	65,11					73,61					
99,25	94,19	93,99	3,5	94,7	99,25	105,43	104,41	1,0	105,2		
	97,44					104,91					
	91,81					104,16					
	89,68					104,88					
	96,82					102,65					

не оказывает значительного влияния на площадь пика ЛХС-1269. Подтверждена также стабильность ЛХС-1269 в модельных смесях при их 3-кратном замораживании/размораживании. Таким образом, для получения достоверных результатов анализ следует проводить немедленно после приготовления проб. При отсутствии такой возможности образцы должны быть заморожены.

### Заключение

Разработана биоаналитическая методика для количественного определения ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-УФ, подобраны оптимальные условия для извлечения ЛХС-1269 из биологических образцов. Валидация методики подтвердила ее соответствие установленным критериям и возможность использования для исследований доклинической фармакокинетики.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Козин Д.А., Шпрах З.С., Решетняк В.Ю. и др. Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств 2020;9(4):128–35. DOI:10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135 Kozin D.A., Shprakh Z.S., Reshetnyak V.Yu. et al. Indolo[2,3-a]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation (review). Razrabotka i registratsia lekarstvennyh sredstv = Drug Development & Registration 2020;9(4):128–35. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135
2. Zenkov R.G., Ektova L.V., Vlasova O.A. et al. Indolo[2,3-a]carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy. Chemistry of Heterocyclic Compounds 2020;56(6):644–58. DOI: 10.1007/5637
3. Ektova L.V., Eremina V.A., Tikhonova N.I. et al. Synthesis and cytotoxic activity of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione n-glycosides substituted on the maleimide nitrogen atom. Pharmaceutical Chemistry Journal 2020;54(5):455–8. DOI: 10.1007/s11094-020-02222-x
4. Vartanyan A.A., Misurina V.A., Baryshnikova M.A., Shprakh Z.S. Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. Melanoma Res 2017;27(1):8–16. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000308
5. Kalitin N.N., Ektova L.V., Kostitsa N.S. et al. A novel glycosylated indolocarbazole derivative LCS 1269 effectively inhibits growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo* through driving of both apoptosis and senescence by inducing of DNA damage and modulating of AKT/mTOR/S6K and ERK pathways. Chem Biol Interact 2022;364:110056. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110056
6. Zenkov R.G., Vlasova O.A., Maksimova V.P. et al. Molecular mechanisms of anticancer activity of N-glycosides of indolocarbazoles LCS-1208 and LCS-1269. Molecules 2021;26(23):7329. DOI: 10.3390/molecules26237329
7. Shprakh Z., Budko A., Kozin D. et al. Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269. Pharmacia 2021;68(2):421–37. DOI: 10.3897/pharmacia.68.E63457
8. Шпрах З.С., Игнатьева Е.В., Козин Д.А. и др. Сравнительный анализ методов количественного определения производного индолокарбазола ЛХС-1269 в лекарственной форме. Химико-фармацевтический журнал 2024;58(12):45–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2024-58-12-45-49 Shprakh Z.S., Ignatyeva E.V., Kozin D.A. et al. Comparative analysis of methods for the quantitative determination of indolocarbazole derivative LCS-1269 in dosage form. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal 2024;58(12):45–9. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2024-58-12-45-49
9. Ingle R.G., Zeng S., Jiang H., Fang W.J. Current developments of bioanalytical sample preparation techniques in pharmaceuticals. J Pharm Anal 2022;12(4):517–29. DOI: 10.1016/j.jpah.2022.03.001

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории химического синтеза Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» и лично заведующему лабораторией химического синтеза, канд. хим. наук Д.В. Гусеву за предоставленную для исследований субстанцию ЛХС-1269.

**Acknowledgements.** The authors express their gratitude to the staff of the chemical synthesis laboratory of the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology”, Ministry of Health of the Russia, and personally to the head of the chemical synthesis laboratory, PhD D.V. Gusev, for providing LHS-1269 substance for research.

### Вклад авторов

Д.А. Козин: разработка дизайна исследования, выполнение экспериментов, анализ полученных данных, написание текста статьи; Н.Ю. Кульбачевская: разработка дизайна исследования, выполнение экспериментов;

В.А. Балыков: выполнение экспериментов, анализ полученных данных;

З.С. Шпрах: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи, редактирование статьи.

### Author's contributions

D.A. Kozin: development of research design, performing of experiments, analysis of the obtained data, writing the text of the article;

N.Yu. Kulbachevskaya: development of research design, performing of experiments;

V.A. Balykov: performing experiments, analyzing of the obtained data;

Z.S. Shprakh: development of research design, analysis of the obtained data, writing the text of the article, article editing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Д.А. Козин / D.A. Kozin: <https://orcid.org/0000-0003-1125-1932>

Н.Ю. Кульбачевская / N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

В.А. Балыков / V.A. Balykov: <https://orcid.org/0000-0002-6689-4452>

З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Доклиническая и фармацевтическая разработка оригинального отечественного противоопухолевого лекарственного средства — ингибитора топоизомеразы I — с целью проведения клинических исследований».

**Funding.** The study has been conducted as part of the applied research funded under State Assignment “Preclinical and pharmaceutical development of the original domestic antitumor drug — topoisomerase I inhibitor — for the clinical trials”.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование одобрено комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (протокол № 06-р-2024 от 17.09.2024).

**Compliance with bioethics principles.** The study was approved by the Commission on Bioethics of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Protocol No. 06-p-2024 dated 17.09.2024).

Статья поступила: 23.12.2024. Принята к публикации: 30.05.2025. Опубликовано онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 23.12.2024. Accepted for publication: 30.05.2025. Published online: 27.06.2025.

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

# Оценка цитотоксического потенциала липосомального гемцитабина

Г.А. Оборотов<sup>1,2</sup>, А.А. Рудакова<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>, М.В. Дмитриева<sup>1</sup>, И.И. Краснюк<sup>2</sup>

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

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

**Контакты:** Григорий Александрович Оборотов [oborot-off@yandex.ru](mailto:oborot-off@yandex.ru)

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

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

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

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

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

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

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

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

## Evaluation of the cytotoxic potential of liposomal gemcitabine

Grigory A. Oborotov<sup>1,2</sup>, Anna A. Rudakova<sup>1</sup>, Maria A. Baryshnikova<sup>1</sup>, Maria V. Dmitrieva<sup>1</sup>, Ivan I. Krasnyuk<sup>2</sup>

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

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

**Contacts:** Grigory Alexandrovich Oborotov [oborot-off@ya.ru](mailto:oborot-off@ya.ru)

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

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

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

**Results.** Liposomal gemcitabine demonstrated higher cytotoxicity compared to free gemcitabine. Half maximal inhibitory concentration value for liposomal gemcitabine was 0.47  $\mu\text{M}$ , while that for free gemcitabine was 9.6  $\mu\text{M}$ .

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

**Keywords:** gemcitabine, liposome, cytotoxic activity, lung cancer

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

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

## Введение

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

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

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

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

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

## Материалы и методы

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

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

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

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

Клетки линии А549 вносили в лунки 96-луночных планшетов в количестве  $7 \times 10^3$  клеток на лунку, через 1 сут в лунки добавляли препараты в следующих концентрациях: 1 мМ; 100, 10, 1 мкМ; 100, 10 нМ. Клетки инкубировали с препаратами в течение 72 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. После завершения инкубации планшеты центрифугировали,

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

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

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

## Результаты

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

С использованием кривых жизнеспособности клеток рассчитаны значения IC<sub>50</sub>. Для липосомального гемцитабина IC<sub>50</sub> составила 0,47 мкМ, а для свободного гемцитабина – 9,6 мкМ. Это подтверждает более высокую эффективность препарата, содержащегося в липосомах, по сравнению с обычным лекарственным раствором.

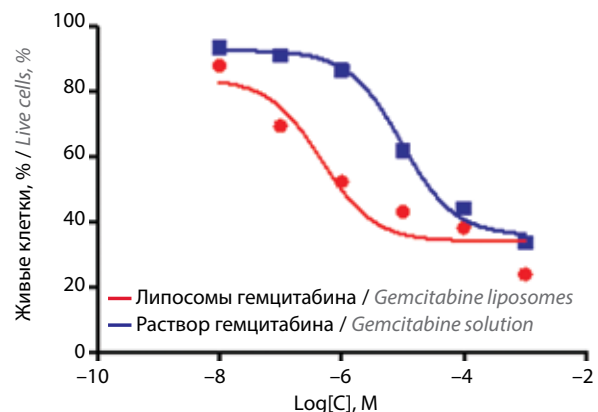


Рис. 1. Цитотоксическая активность липосомального гемцитабина и раствора гемцитабина

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

## Заключение

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

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

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

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

**Вклад авторов**

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

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

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

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

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

**Author's contributions**

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

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

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

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

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

**ORCID авторов / ORCID of authors**

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

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

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

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

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Funding.** This study was performed without external funding.

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

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