

# ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПАТОМОРФОЗ ГЛИОБЛАСТОМЫ 101.8 У КРЫС ЛИНИИ WISTAR ПРИ ЛЕЧЕНИИ НАНОРАЗМЕРНОЙ ФОРМОЙ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

DOI: 10.17691/stm2018.10.4.12  
УДК 616.831–006.484:615.277.3  
Поступила 25.05.2018 г.



**В.В. Федосеева**, научный сотрудник лаборатории нейроморфологии<sup>1</sup>;  
**Е.А. Постовалова**, научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления<sup>1</sup>;  
**А.С. Халанский**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии<sup>1</sup>;  
**В.А. Разживина**, к.б.н., старший руководитель проектов<sup>2</sup>;  
**С.Э. Гельперина**, д.х.н., зав. лабораторией систем доставки<sup>2</sup>;  
**О.В. Макарова**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммуноморфологии воспаления<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт морфологии человека, ул. Цюрупы, 3, Москва, 117418;

<sup>2</sup>ООО «Технология лекарств», ул. Рабочая, 2а, Химки, Московская область, 141400

**Цель исследования** — изучение лекарственного патоморфоза глиобластомы 101.8 у крыс линии Wistar после лечения различными формами доксорубицина: наноразмерной формой на основе полилактидных наночастиц и субстанцией доксорубицина.

**Материалы и методы.** В работе использовали наноразмерную форму доксорубицина на основе наночастиц сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). Исследование выполнено на 33 самцах крыс линии Wistar, получавших субстанцию доксорубицина (ДОКС) или доксорубицин, включенный в наночастицы (ДОКС-PLGA), в дозе 1,5 мг/кг массы тела на 2, 5 и 8-е сутки после перевивки опухоли. Перед введением лиофилизированные наночастицы ресуспендировали в воде (ДОКС-PLGA) или в 1% водном растворе полоксамера 188 (ДОКС-PLGA/P188). На 14-е сутки после перевивки подсчитывали количество митотически делящихся и гибнущих опухолевых клеток, вычисляли коэффициент клеточного обновления опухоли. Количество и объемную долю кровеносных сосудов в опухолях определяли на гистологических срезах, окрашенных изолектином В4.

**Результаты.** По сравнению с нелечеными животными у крыс с глиобластомой 101.8, получавших лекарственные средства, на 6-е сутки после окончания лечения выявлено увеличение гибели и снижение пролиферативной активности опухолевых клеток, а также коэффициента клеточного обновления опухоли. При лечении ДОКС, ДОКС-PLGA/P188 у животных наблюдалось снижение объемной доли и количества кровеносных сосудов в опухолях. Максимальная противоопухолевая активность по данным оценки патоморфоза глиобластомы 101.8 выявлена при лечении препаратом ДОКС-PLGA/P188. Полученные результаты экспериментального исследования позволяют рассматривать ДОКС в PLGA-наночастицах, модифицированных P188, как наиболее эффективное противоопухолевое средство.

**Ключевые слова:** экспериментальная глиобластома; доксорубицин; PLGA-наночастицы; полоксамер 188; лекарственный патоморфоз.

**Как цитировать:** Fedoseeva V.V., Postovalova E.A., Khalansky A.S., Razzhivina V.A., Gelperina S.E., Makarova O.V. Drug-induced pathomorphosis of glioblastoma 101.8 in Wistar rats treated with doxorubicin bound to poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(4): 105–112, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.12>

## English

## Drug-Induced Pathomorphosis of Glioblastoma 101.8 in Wistar Rats Treated with Doxorubicin Bound to Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles

**V.V. Fedoseeva**, Researcher, Laboratory of Neuromorphology<sup>1</sup>;  
**E.A. Postovalova**, Researcher, Laboratory of Inflammation Immunomorphology<sup>1</sup>;  
**A.S. Khalansky**, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Neuromorphology<sup>1</sup>;  
**V.A. Razzhivina**, PhD, Senior Project Manager<sup>2</sup>;  
**S.E. Gelperina**, DSc, Head of the Laboratory of Drug Delivery Systems<sup>2</sup>;  
**O.V. Makarova**, MD, Professor, Head of the Laboratory of Inflammation Immunomorphology<sup>1</sup>

**Для контактов:** Федосеева Вера Владимировна, e-mail: vera\_mgavmb@rambler.ru

<sup>1</sup>Research Institute of Human Morphology, 3 Tsurupy St., Moscow, 117418, Russia;

<sup>2</sup>LLC "Drugs Technology", 2a Rabochaya St., Khimki, Moscow Region, 141400, Russia

**The aim of the investigation** was to study drug-induced pathomorphosis of glioblastoma 101.8 in Wistar rats treated with different doxorubicin formulations: doxorubicin bound to polylactide nanoparticles and doxorubicin substance.

**Materials and Methods.** Doxorubicin bound to poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles was used in the investigation. The study was performed on 33 male Wistar rats receiving doxorubicin (DOX) substance or doxorubicin-loaded nanoparticles (DOX-PLGA) at a dose of 1.5 mg/kg (body weight) on days 2, 5, and 8 post tumor transplantation. Lyophilized nanoparticles were resuspended in water (DOX-PLGA) or in 1% aqueous solution of poloxamer 188 (DOX-PLGA/P188) before intravenous administration. The number of mitotically dividing and dying tumor cells was counted, and the tumor cell renewal coefficient was calculated for evaluation of pathomorphosis of glioblastoma 101.8 induced by doxorubicin, on day 14 post transplantation. The number and volume fraction of blood vessels in tumors were determined on histological sections stained with isolectin B4.

**Results.** On day 6 post treatment, the tumors in rats treated with all doxorubicin formulations exhibited an increase of cell death rate, decreased proliferative activity, and a lower indicator of cell renewal coefficient of tumor cells, compared to untreated animals. A decrease in the volume fraction and number of blood vessels in the tumors was also observed in the animals subjected to chemotherapy. According to the tumor pathomorphosis parameters assessed in this study, the most effective formulation was DOX-PLGA/P188.

**Key words:** experimental glioblastoma; doxorubicin; PLGA nanoparticles; poloxamer 188; drug-induced pathomorphosis.

## Введение

Глиобластома — быстрорастущая низкодифференцированная опухоль головного мозга, плохо поддающаяся лечению. Продолжительность жизни больных с глиобластомой после установления диагноза редко превышает 12 мес [1]. Основным методом лечения — хирургическое удаление опухоли с последующей радиолучевой терапией, в то время как химиотерапии отводится в основном лишь вспомогательная роль [2]. Одной из причин низкой эффективности химиотерапии при опухолях ЦНС является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), ограничивающий доступ большинства лекарственных веществ в мозг. В центральных зонах опухолю функции ГЭБ нарушаются, поскольку новообразованные сосуды, несовершенные в анатомическом, функциональном и гистологическом отношении, отличаются повышенной проницаемостью. Однако в зонах инфильтративного роста опухоли ГЭБ сохраняет функциональность, препятствуя созданию в этих зонах терапевтически эффективных концентраций лекарственных веществ [3]. Данный факт обуславливает актуальность поиска путей повышения эффективности химиотерапии опухолей мозга и, в частности, глиобластом.

Одним из перспективных направлений в этой области является применение систем доставки лекарственных веществ. Наночастицы на основе биополимеров способны доставить противоопухолевые вещества, которые без этих наночастиц лишь ограниченно проникают через ГЭБ. В опухоли наночастицы накапливаются и постепенно выделяют инкапсулированное лекарственное вещество, поддерживая его терапевтически эффективную концентрацию [3, 4].

В онкотерапии широко применяется антрациклиновый антибиотик доксорубин (ДОКС). Его молекулы встраиваются в ДНК и повреждают ее, вызывают остановку пролиферации или гибель опухолевых клеток.

Цитотоксическое действие доксорубина обусловлено генерацией свободных форм кислорода и способностью ингибировать рост кровеносных сосудов в опухоли [5, 6]. Считается, однако, что, будучи субстратом Р-гликопротеина, доксорубин не проникает через ГЭБ и потому не может использоваться для химиотерапии опухолей мозга. В то же время показано, что лечение глиобластомы 101.8 наноразмерными формами доксорубина на основе полибутилцианоакрилатных (PBCA) и полилактидных (PLGA) наночастиц увеличивает выживаемость, продолжительность жизни животных, приводит к уменьшению объема опухоли и торможению ее роста [7–9].

Противоопухолевый эффект ДОКС-наночастиц усиливается, если поверхность наночастиц модифицирована полуксамером 188 (плюрони́к F68, P188 и др.) [8]. Полуксамеры — полимерные соединения, блок-сополимеры полиоксиэтилена (гидрофобная часть молекулы) и полиоксипропилена (гидрофильная часть молекулы), их разное сродство к воде придает полуксамерам в водном растворе свойства поверхностно-активных веществ. Они используются как транспортные системы для доставки лекарственных веществ к пораженным органам и тканям [10]. Полуксамер 188 увеличивает растворимость и всасываемость различных гидрофобных соединений, обладает тромболитическим действием, улучшает реологию крови, встраивается в клеточные мембраны, способствуя устранению их дефектов, активирует фагоцитоз [11]. После введения наночастиц PLGA в кровь полуксамер 188, адсорбированный на их поверхности, способствует адсорбции апополипротеинов E и A, которые взаимодействуют с рецепторами LDL, экспрессированными на мембранах эндотелиальных клеток, образующих ГЭБ, и таким образом опосредуют эндоцитоз наночастиц в эти клетки. Наночастицы затем проникают в мозг посредством трансцитоза [10].

Для оценки противоопухолевой эффективности

химио- и радиотерапии используют «золотой стандарт» — морфологическое исследование, которое в сочетании с морфометрическим и молекулярно-биологическим методами позволяет прогнозировать рецидивирование и выживаемость у онкологических больных [12].

С целью определения эффективности лечения с использованием различных форм доксорубина — его субстанции или наноразмерной формы на основе полилактидных частиц — у крыс линии Wistar выполнена сравнительная оценка лекарственного патоморфоза глиобластомы 101.8 после противоопухолевой терапии.

## Материалы и методы

Наночастицы получали из субстанции ДОКС (Sicor S.p.A, Италия) и сополимера молочной и гликолевой кислот PLGA (Resomer RG 502H; Evonik Röhm, Германия) методом двойных эмульсий при соотношении ДОКС:PLGA как 1:10 [4]. После удаления органических растворителей полученную наносuspension лиофилизировали с добавлением криопротектора (1% маннита). Средний диаметр полученных частиц, определенный методом фотонной корреляционной спектроскопии (Zetasizer Nano ZS; Malvern, Великобритания), составлял ~100 нм, степень включения доксорубина ~90%. Перед введением животным лиофилизированные наночастицы ресуспендировали в воде (ДОКС-PLGA) или в 1% водном растворе полоксамера 188 (ДОКС-PLGA/P188).

Исследование выполнено на 33 самцах крыс линии Wistar массой тела 150–200 г. При работе с животными руководствовались приказом №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (Россия, 2016) и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), а также «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Мионов А.Н. и др., 2012). При этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Исследование было одобрено биоэтической комиссией НИИ морфологии человека.

Глиобластома 101.8 крысы была впервые получена и поддерживается в коллекции НИИ морфологии человека [13]. Ткань опухоли трансплантировали в головной мозг крыс под наркозом (Золетил 100 в дозе 6 мг/100 г массы тела животного). Методика трансплантации опухоли детально описана в предыдущей работе [7].

Животные с имплантированными опухолями были разделены на 4 группы в зависимости от получаемых препаратов: субстанции доксорубина (ДОКС; n=6); наноразмерной формы доксорубина на основе на-

ночастиц PLGA, модифицированных полоксамером 188 (ДОКС-PLGA/P188; n=9) или немодифицированных (ДОКС-PLGA; n=11). В качестве контроля использовали нелеченых животных (n=7). Препараты вводили внутривенно на 2, 5 и 8-е сутки после трансплантации опухоли в дозе 1,5 мг/кг.

С целью гистологического исследования глиобластомы 101.8 животных выводили из эксперимента на 14-е сутки после имплантации опухоли (6-е сутки после лечения). Головной мозг фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, изготавливали гистологические срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином.

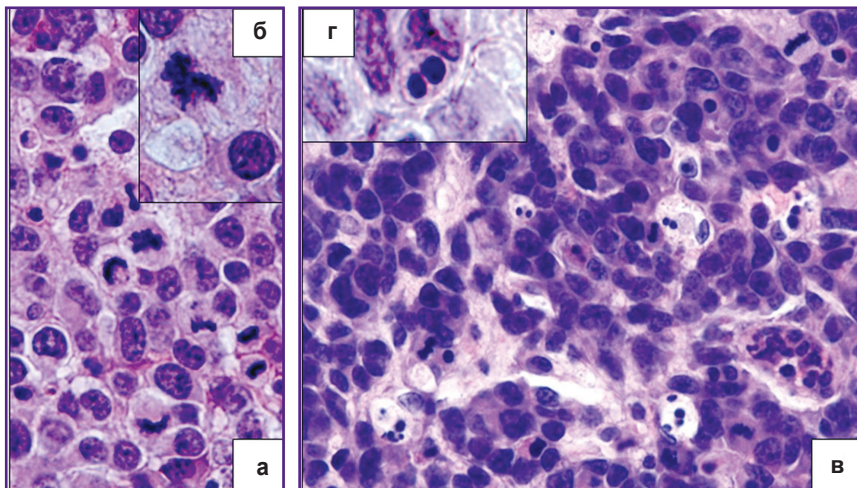
Для оценки пролиферативного потенциала, гибели клеток и вычисления коэффициента клеточного обновления глиобластомы 101.8 подсчитывали количество митозов и гибнущих клеток на стандартной площади гистологического среза (65 025 мкм<sup>2</sup>; x400). В каждом наблюдении в зависимости от размера опухоли подсчет проводили в 5–10 полях зрения. Коэффициент клеточного обновления (ККО) опухоли вычисляли по формуле: ККО = число митозов / число гибнущих клеток.

Кровеносные сосуды в глиобластоме 101.8 выявляли с помощью гистохимической реакции с изолектином В4 (Vector Lab, США), при которой маркируются эндотелиальные клетки. Оценивали количество сосудов в поле зрения при увеличении 200. Методом точечного счета с помощью сетки Г.Г. Автандилова [14] определяли объемную долю кровеносных сосудов.

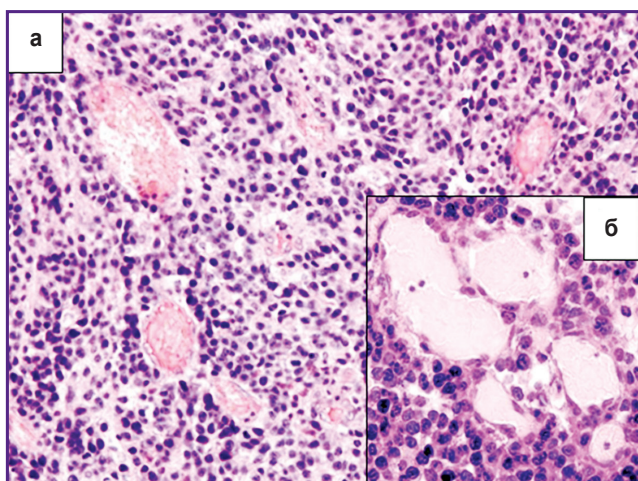
Статистическая обработка данных проведена с применением пакета программ Statistica 6.1, использован непараметрический метод. Характеристикой экспериментальных групп служила медиана (Me) и квартильный размах (25; 75%). Для сравнения экспериментальных групп был применен однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, для множественного сравнения — метод Данна и метод Коновера.

## Результаты

При морфологическом исследовании глиобластомы 101.8 у крыс разных экспериментальных групп все опухоли характеризовались высокой клеточностью, выраженной атипией опухолевых клеток с гиперхромией ядер, полиморфизмом по форме и размерам. Среди опухолевых клеток было много митотически делящихся (рис. 1, а, б). Встречались патологические митозы: концентрические митозы, полая метафаза, асимметричные митозы, колхициновые митозы. Отмечалось много гибнущих клеток с гомогенным базофильным ядром или фрагментацией ядер, гомогенной эозинофильной цитоплазмой, клеток-теней с плохо определяемыми контурами, слабобазофильными ядрами и вакуолизированной цитоплазмой (рис. 1, в, г). Наблюдался инфильтративный периваскулярный и перинейрональный рост опухоли в окружающую ткань головного мозга: опухолевые клетки



**Рис. 1. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8:** группа без лечения: а — фигуры митоза; б — многополюсный митоз; гибнущие клетки: в — группа ДОКС; г — группа ДОКС-PLGA/P188; картина «звездного неба»; окраска гематоксилином и эозином; увеличение: а — 400; в — 640; б, г — 1000



**Рис. 2. Морфологическая характеристика кровеносных сосудов в глиобластоме 101.8:** а — ДОКС P188; кровеносные сосуды с тонкими стенками; б — ДОКС-PLGA; сосудистая розетка — скопление сгруппированных кровеносных сосудов овальной формы с тонкими стенками; окраска гематоксилином и эозином; увеличение: а — 400, б — 640

в пограничной зоне образовывали скопления вокруг сосудов и гибнущих нейронов. Вокруг нейронов они нередко формировали железистоподобные структуры.

Во всех опухолях выявлялось большое количество кровеносных сосудов, которые формировали скопления в виде сосудистых «розеток» (рис. 2). Сосуды были с деформированными просветами, округлой или овальной формы и тонкой стенкой, представленной эндотелием и небольшим количеством тонких волокон, также определялись сосуды щелевидной формы с пролиферацией эндотелия и с частично сформированной стенкой (рис. 3).

В опухолях часто выявлялись мелкие и обширные кровоизлияния — от единичных до множественных. Во многих опухолях, особенно с относительно большими размерами, определялись очаговые некрозы, среди них встречались некрозы с палисадообразным расположением опухолевых клеток. В перитуморальной зоне выявлялись сетчатый, периваскулярный и перичеллюлярный отек, гибель нейронов, которые были гиперхромными по типу гипоксических нейронов, а также с явлением цитолиза.

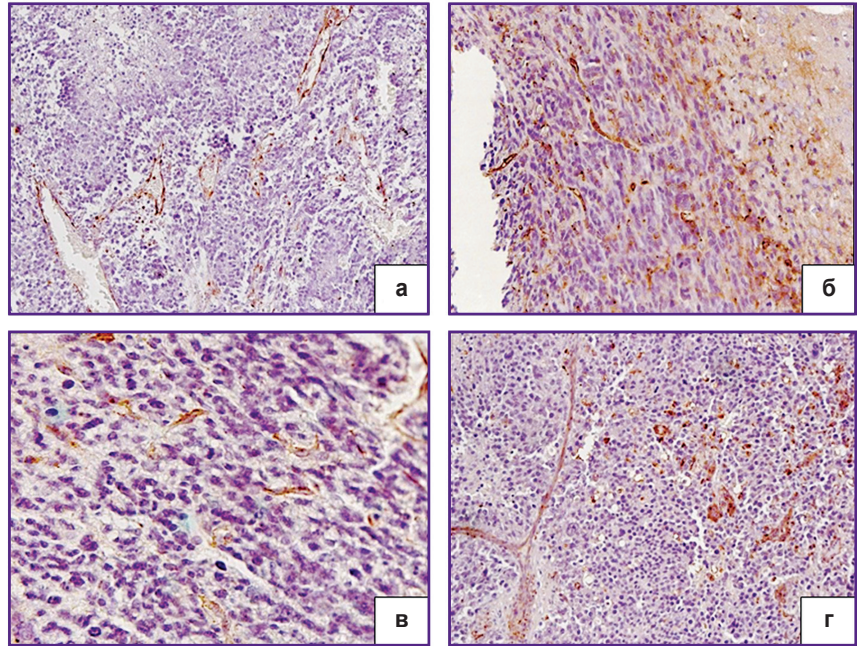
Выявленные морфологические особенности экспериментальной глиобластомы 101.8 соответствуют основным характеристикам глиобластомы человека (высокая атипия опухолевых клеток, наличие большого количества кровеносных сосудов, некрозов и кровоизлияний), что позволяет предполагать одинаковые реакции на лечение.

По сравнению с крысами, не получавшими лечения, у животных экспериментальных групп, леченных ДОКС, ДОКС-PLGA и ДОКС-PLGA/P188, выявлены признаки лекарственного патоморфоза: размеры опухолей были значительно меньше; у большинства животных некрозы отсутствовали; у половины крыс обнаружены клетки-«монстры» — от единичных в препарате и поле зрения до 5–7 клеток в поле зрения (рис. 4). Кровеносные сосуды были в основном щелевидными с частично сформированными тонкими стенками и деформированными просветами. Следует отметить, что в пределах каждой из исследованных групп животных выраженность лекарственного патоморфоза варьировала.

По сравнению с нелечеными во всех группах жи-

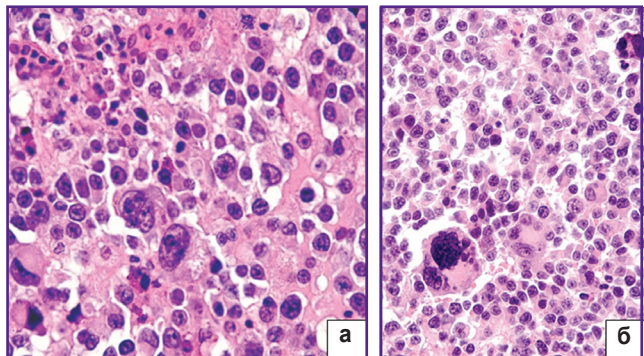
**Рис. 3. Гистохимическая реакция с изолектином В4 — маркером эндотелиальных клеток:**

а — группа без лечения, сосуды с широкими деформированными просветами и тонкими стенками; б, в, г — сосуды с частично сформированными стенками и щелевидным просветом: б — ДОКС; в — ДОКС-PLGA; г — ДОКС-PLGA/P188; увеличение: а, г — 100; б, в — 200



**Рис. 4. Морфологическая характеристика клеток глиобластомы 101.8:**

а — ДОКС-PLGA/P188; б — ДОКС-PLGA; опухоли с высокой клеточностью из полиморфных атипичных клеток с гиперхромными ядрами и узким ободком цитоплазмы; среди атипичных клеток — многоядерные клетки-«монстры»; окраска гематоксилином и эозином; увеличение: а — 640; б — 400



вотных, получавших лечение, число гибнущих клеток в опухоли было увеличено, а показатели митозов — снижены. Минимальное количество митозов отмечалось у крыс с глиобластомой после лечения ДОКС-PLGA/P188 (табл. 1).

По сравнению с нелечеными животными в опухолях после лечения практически во всех группах крыс было снижено абсолютное количество кровеносных сосудов. В группе ДОКС-PLGA/P188 этот показатель был самым низким, в группе ДОКС-PLGA он не отличался от группы без лечения.

При морфометрическом исследовании глиобластомы 101.8 показатель медианы объемной доли сосудов уменьшался во всех группах леченых животных. В группах ДОКС

Таблица 1

**Количество митотически делящихся, гибнущих клеток опухоли и коэффициент клеточного обновления у крыс с глиобластомой, % (Me [25; 75])**

Группы	Делящиеся клетки	Гибнущие клетки	Коэффициент клеточного обновления
1. Без лечения	15 [7; 11]	2 [1; 3]	6,5 [4,0; 9,5]
2. ДОКС	11 [9; 11]	10,0 [7,0; 13,5]	1,04 [0,78; 1,28]
3. ДОКС-PLGA	8,0 [6,0; 12,5]	8,0 [4,0; 14,5]	1,52 [0,45; 3,12]
4. ДОКС-PLGA/P188	5 [4; 6]	14,5 [10,0; 17,0]	0,38 [0,25; 0,5]
p	p (1-2)=0,01 p (1-3)=2,3E p (1-4)=0,00002 p (2-3)=0,007 p (2-4)=2,55E p (3-4)=1,52E	p (1-2)=0,00002 p (1-3)=3,11E p (1-4)=0,00001 p (2-3)=0,02 p (2-4)=0,01 p (3-4)=5,59E	p (1-2)=0,00001 p (1-3)=0,00003 p (1-4)=0,00001 p (2-4)=1,28E p (3-4)=3,37E

и ДОКС-PLGA/P188 этот показатель был низким (табл. 2).

Таким образом, по сравнению со всеми экспери-

Таблица 2

**Объемная доля и количество кровеносных сосудов в глиобластоме 101.8 у крыс при введении разных форм доксорубицина (Me [25; 75])**

Группы (число наблюдений)	Объемная доля кровеносных сосудов, об.%	Количество кровеносных сосудов
1. Без лечения (n=171)	5 [3; 6]	5 [4; 6]
2. ДОКС (n=89)	1,5 [0,5; 2,5]	3 [2; 4]
3. ДОКС-PLGA (n=69)	4 [2; 6]	5 [4; 6]
4. ДОКС-PLGA/P188 (n=78)	2 [1; 3]	2 [1; 3]
p	p (1-2)=3E-06 p (1-4)=0,003 p (2-3)=1E-04 p (3-4)=0,005	p (1-2)=4E-10 p (1-4)=0,012 p (2-3)=7E-06 p (2-4)=6E-04 p (3-4)=0,026

ментальными группами количество и объемная доля кровеносных сосудов в опухоли были статистически значимо ниже в группе животных, получавших ДОКС-PLGA/P188.

### Обсуждение

Выявленные морфологические изменения в глиобластоме 101.8 при воздействии химиопрепарата ДОКС и его наносомальной формы следует расценивать как проявления лекарственного патоморфоза. Проблема лекарственного патоморфоза детально охарактеризована Е.Ф. Лушниковым [15]: патоморфоз — это как общие, так и местные проявления опухолевого роста под влиянием какого-либо воздействия. В современном понимании патоморфоз (от греч. *pathos* — болезнь и *morphosis* — формирование) — стойкое изменение клинической и морфологической картины болезни под влиянием факторов окружающей среды. Вопрос о морфологических критериях лекарственного («индуцированного», «лечебного», «терапевтического») патоморфоза опухолей продолжает оставаться дискуссионным и во многом зависит от природы опухоли, вида воздействия, механизма действия, режима введения препаратов и т.п. Наиболее значимыми параметрами патоморфоза являются: активность и характер роста опухоли, наличие и выраженность атипии клеток, соотношение объемных долей стромы и паренхимы, полиморфизм либо единообразие формы и размера клеток, ядерно-цитоплазматическое соотношение, наличие и количество митозов, гибнущих клеток, дистрофические изменения в опухолевых клетках. При этом важно учитывать характер ангиогенеза, оцениваемый по микрососудистой плотности, суммарному периметру сосудов и суммарной их площади, наличие очагов некроза и геморрагий и т.д. [16–20].

Стандарт оценки лекарственного патоморфоза злокачественных опухолей головного мозга человека до сих пор не разработан. Основой для оценки

морфологических изменений при лечении экспериментальной глиобластомы 101.8 является классификация С. Daumas-Duport [21], которая используется для прогнозирования течения глиобластомы у человека. Классификация основана на четырех морфологических признаках: атипия ядер, митотическая активность, пролиферация эндотелиальных клеток, некрозы (0 — отсутствие признака или его сомнительное проявление; 1 — наличие). Прогностическая значимость митотического индекса и индекса гибели клеток при лечении опухоли подтверждена на достаточно большом числе злокачественных опухолей разных локализаций [18, 22].

При изучении гистологических препаратов глиобластомы 101.8 всех опытных групп у большинства крыс, получавших лечение, были выявлены описанные признаки лекарственного патоморфоза: уменьшение объемов опухолей, более редкое развитие некрозов у большинства животных. Во многих опухолях у леченых животных определялись клетки-«монстры», что расценивается как один из признаков регрессии опухоли после химиотерапии [23].

Патоморфоз глиобластомы 101.8 под действием всех исследованных препаратов включал также интенсификацию процессов гибели опухолевых клеток. Глиобластомы животных группы ДОКС-PLGA/P188 характеризовались увеличенным процентом гибели опухолевых клеток по сравнению с группой крыс, леченых ДОКС.

Все лекарственные формы доксорубицина снижали пролиферативную активность опухолевых клеток и увеличивали их гибель. В связи с этим коэффициент клеточного обновления у леченых животных был ниже, чем у нелеченых.

Глиобластома 101.8 характеризуется высокой васкуляризацией, а ее снижение служит одним из показателей оценки эффективности лечения опухоли [15]. Абсолютное число кровеносных сосудов опухоли и их объемная доля снижались во всех группах животных, подвергавшихся лечению. Однако наилучший результат отмечен для группы животных, получавших ДОКС-PLGA/P188.

Полученные данные коррелируют с ранее описанными результатами исследования противоопухолевой активности наноразмерных форм доксорубицина в отношении глиобластомы 101.8. Так, в работах Т. Hekmatara и соавт. [5], А.С. Халанского и соавт. [24], S.C. Steiniger и соавт. [9] показано, что лекарственный патоморфоз экспериментальной глиобластомы 101.8 у крыс линии Wistar при лечении наносомальной формой доксорубицина на основе наночастиц ПВСА характеризуется уменьшением размеров опухоли и степени ее васкуляризации, распространенности некрозов, снижением пролиферативного индекса [25], а также уменьшением объемной плотности сосудов и

некрозов в опухоли. Высокая эффективность лечения глиобластомы 101.8 наноразмерной формой доксорубина на основе наночастиц PLGA была показана также S. Wohlfart и соавт. [26], которые использовали полуколичественную оценку степени выраженности некрозов и «сосудистых розеток».

## Заключение

Все лекарственные формы доксорубина снижают пролиферативную активность опухолевых клеток и увеличивают их гибель, тем самым уменьшая коэффициент клеточного обновления у леченых животных. Наиболее эффективными лекарственными формами, снижающими пролиферативную активность и увеличивающими гибель опухолевых клеток, являются ДОКС-PLGA и ДОКС-PLGA/P188. При введении разных лекарственных форм доксорубина по сравнению с группой нелеченых животных объемная доля кровеносных сосудов в опухоли снижается только в группах крыс, леченных ДОКС и ДОКС-PLGA/P188.

На основе оценки патоморфоза глиобластомы 101.8 по принятым морфологическим признакам максимальная противоопухолевая активность принадлежит препарату ДОКС-PLGA/P188. Полученные результаты экспериментального исследования позволяют рассматривать ДОКС в PLGA-наночастицах, ресуспендированных в 1% водном растворе полоксамера P188, как наиболее эффективное противоопухолевое средство.

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

**Конфликт интересов.** Конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

## Литература/References

- Johnson D.R., Omuro A.M.P., Ravelo A., Sommer N., Guerin A., Ionescu-Iltu R., Shi S., Macalalad A., Uhm J.H. Overall survival in patients with glioblastoma before and after bevacizumab approval. *Curr Med Res Opin* 2018; 34(5): 813–820, <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1392294>.
- Furnari F.B., Fenton T., Bachoo R.M., Mukasa A., Stommel J.M., Stegh A., Hahn W.C., Ligon K.L., Louis D.N., Brennan C., Chin L., DePinho R.A., Cavenee W.K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; 21(21): 2683–2710, <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>.
- Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release* 2012; 164(2): 138–144, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.038>.
- Malinovskaya Y., Melnikov P., Baklaushev V., Gabashvili A., Osipova N., Mantrov S., Ermolenko Y., Maksimenko O., Gorshkova M., Balabanyan V., Kreuter J.,

Gelperina S. Delivery of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles into U87 human glioblastoma cells. *Int J Pharm* 2017; 524(1–2): 77–90, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.049>.

5. Hekmatara T., Bernreuther C., Khalansky A.S., Theisen A., Weissenberger J., Matschke J., Gelperina S., Kreuter J., Glatzel M. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects. *Clin Neuropathol* 2009; 28(3): 153–164, <https://doi.org/10.5414/npp28153>.

6. Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T.E., Altman R.B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21(7): 440–446, <https://doi.org/10.1097/fpc.0b013e328333ffb56>.

7. Федосеева В.В., Халанский А.С., Мхитаров В.А., Цветков И.С., Малиновская Ю.А., Максимова О.О., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю., Разживина В.А., Гореликов П.Л., Михайлова Л.П., Макарова О.В. Противоопухолевая активность доксорубина в составе поли(лактид-ко-гликолидных) наночастиц при экспериментальной глиобластоме. Клиническая и экспериментальная морфология 2017; 2(22): 65–71. Fedoseeva V.V., Khalansky A.S., Mkhitarov V.A., Tsvetkov I.S., Malinovskaya Y.A., Maksimenko O.O., Gelperina S.E., Balabanyan V.Y., Razzhivina V.A., Gorelikov P.L., Mikhailova L.P., Makarova O.V. Anti-tumor activity of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in the experimental glioblastoma. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya* 2017; 2(22): 65–71.

8. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 74(2): 157–163, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.09.003>.

9. Steiniger S.C., Kreuter J., Khalansky A.S., Skidan I.N., Bobruskin A.I., Smirnova Z.S., Severin S.E., Uhl R., Kock M., Geiger K.D., Gelperina S.E. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int J Cancer* 2004; 109(5): 759–767, <https://doi.org/10.1002/ijc.20048>.

10. Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 71: 2–14, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.008>.

11. Moghimi S.M., Hunter A.C. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol* 2000; 18(10): 412–420, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01485-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01485-2).

12. Westerterp M., van Westreenen H.L., Reitsma J.B., Hoekstra O.S., Stoker J., Fockens P., Jager P.L., Van Eck-Smit B.L., Plukker J.T., van Lanschot J.J., Sloof G.W. Esophageal cancer: CT, endoscopic US, and FDG PET for assessment of response to neoadjuvant therapy — systematic review. *Radiology* 2005; 236(3): 841–851, <https://doi.org/10.1148/radiol.2363041042>.

13. Коллекция экспериментальных опухолей нервной системы и нейральных опухолевых клеточных линий. *Collection of experimental tumors of the nervous system and neural tumor cell lines*. URL: <http://ckp-rf.ru/usu/498710/>.

14. Автандилов Г.Г. Морфология в патологии. М: Медицина; 1973; 277 с. Avtandilov G.G. *Morfologiya v patologii* [Morphology in pathology]. Moscow: Meditsina; 1973; 277 p.

15. Лушников Е.Ф. Лучевой патоморфоз опухолей человека. М: Медицина; 1977; 328 с. Lushnikov E.F. *Luchevoy patomorfoz opukholey cheloveka* [Radiation pathomorphosis of human tumors]. Moscow: Meditsina; 1977; 328 p.
16. Лавникова Г.А. Некоторые закономерности лучевого патоморфоза опухолей человека и их практическое использование. Вестник АМН СССР 1976, 6: 13–19. Lavnikova G.A. Some regularities of radiation pathomorphosis of human tumors and their practical use. *Vestnik AMN SSSR* 1976, 6: 13–19.
17. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. Под ред. Краевского Н.А., Смоляникова А.В., Саркисова Д.С. М: Медицина; 1993; 560 с. *Patologoanatomicheskaya diagnostika opukholey cheloveka* [Pathoanatomical diagnosis of human tumors]. Pod red. Kraevskogo N.A., Smolyannikova A.V., Sarkisova D.S. [Kraevskiy N.A., Smolyannikov A.V., Sarkisov D.S. (editors)]. Moscow: Meditsina; 1993; 560 p.
18. Staunton M.J., Gaffney E.F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am J Clin Pathol* 1995, 103(3): 300–307, <https://doi.org/10.1093/ajcp/103.3.300>.
19. Казанцева И.А., Геганов Л.Е. Морфологические показатели клеточного обновления в карциномах желудка и их прогностическое значение. Архив патологии 2014; 4: 3–8. Kazantseva I.A., Gaganov L.E. The morphological parameters of cell regeneration in gastric carcinomas and their prognostic value. *Arkhiv patologii* 2014; 4: 3–8.
20. Takagi H., Azuma K., Tsuka T., Imagawa T., Osaki T., Okamoto Y. Antitumor effects of high-temperature hyperthermia on a glioma rat model. *Oncol Lett* 2014; 7(4): 1007–1010, <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1852>.
21. Daumas-Duport C., Scheithauer B., O'Fallon J., Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988; 62(10): 2152–2165, [https://doi.org/10.1097-0142\(19881115\)62:10<2152::aid-cnrcr2820621015>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19881115)62:10<2152::aid-cnrcr2820621015>3.0.co;2-t).
22. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М: Медицина; 2001; 190 с. Lushnikov E.F., Abrosimov A.Yu. *Gibel' kletki (apoptoz)* [Cell death (apoptosis)]. Moscow: Meditsina; 2001; 190 p.
23. Chang F., Deere H., Mahadeva U., George S. Histopathologic examination and reporting of esophageal carcinomas following preoperative neoadjuvant therapy: practical guidelines and current issues. *Am J Clin Pathol* 2008; 129(2): 252–262, <https://doi.org/10.1309/ccr3qn4874yjdjj7>.
24. Халанский А.С., Хекматара Т., Бернройтер К., Рубцов Б.В., Кондакова Л.И., Матчке Й., Кройтер Й., Глатцел М., Гельперина С.Э., Швец В.И. Морфологическая оценка противоопухолевого эффекта наносомальной формы доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы у крыс. Биофармацевтический журнал 2011; 3(2): 41–50. Khalansky A.S., Hekmatara T., Bernreuther C., Rubtsov B.V., Kondakova L.I., Matschke J., Kreuter J., Glatzel M., Gelperina S.E., Shvets V.I. Morphological evaluation of the antitumor effect of the nanoparticle-bound doxorubicin in a rat glioblastoma model. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal* 2011; 3(2): 41–50.
25. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. Биологическая характеристика. Клиническая и экспериментальная морфология 2013; 4: 63–69. Khalansky A.S., Kondakova L.I. Transplanted rat glioma 101.8. Biological characteristics. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya* 2013; 4: 63–69.
26. Wohlfart S., Khalansky A.S., Gelperina S., Maksimenko O., Bernreuther C., Glatzel M., Kreuter J. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PLoS One* 2011; 6(5): e19121, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019121>.