

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРИЗОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА К ХИМИОТЕРАПИИ

Розиев Р.А.¹, Хомякова Т.И.^{1,2,3}, Алексеева А.И.², Еримбетов К.Т.¹, Гончарова А.Я.¹,
Косырева А.М.², Хомяков Ю.Н.³

¹ ООО «Научно-исследовательский технологический центр «Превентивной
информационной медицины» (ООО «НИТЦ ПРИМ»), г. Обнинск

² НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. В.Б. Петровского»,
г. Москва

³ НОЧУ «Университет «Синергия»

Реферат

Глиобластома человека - распространенное первичное злокачественное новообразование головного мозга, которое плохо поддается химиотерапевтическому лечению. Для повышения эффективности могут использоваться адьюванты, повышающие доступность препарата либо чувствительность опухоли к терапии. Целью данного исследования было изучение эффекта введения Крунидона (полимеризованного гемоглобина) на эффективность химиотерапии доксорубицином глиобластомы крыс 101/8. Было показано, что внутривенная инфузия полимеризованного гемоглобина одновременно с химиотерапевтическим препаратом может способствовать повышению эффективности терапии в тех же дозах или снижению дозы химиотерапевтического препарата при сохранении эффективности и уменьшении побочных эффектов химиотерапии.

Ключевые слова: Крунидон, глиобластома 101/8, сенситизатор, доксорубицин

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF A DRUG BASED ON POLYMERIZED HEMOGLOBIN TO INCREASE THE SENSITIVITY OF GLIOBLASTOMA OF THE BRAIN TO CHEMOTHERAPY

Rosiev R.A.¹, Khomyakova T.I.^{1,2,3}, Alekseeva A.I.², Yerimbetov K.T.¹, Goncharova A.Ya.¹,
Kosyreva A.M.², Khomyakov Yu.N.³

¹ ООО «NITZ PRIM», Obninsk LLC

² Federal State Budgetary Institution "RNTSKH named after Academician V.B.
Petrovsky", Moscow

³ NOCHU "Synergy University"

Summary

Human glioblastoma is a common primary malignant neoplasm of the brain that does not respond well to chemotherapeutic treatment. Adjuvants can be used to increase the effectiveness, increasing the availability of the drug or the sensitivity of the tumor to therapy. The purpose of this study was to study the effect of administration of crunidone (polymerized hemoglobin) on the

effectiveness of chemotherapy with doxorubicin for rat glioblastoma 101/8. It has been shown that intravenous infusion of polymerized hemoglobin simultaneously with a chemotherapeutic drug can increase the effectiveness of therapy at the same doses or reduce the dose of a chemotherapeutic drug while maintaining the effectiveness and reducing the side effects of chemotherapy.

Key words: crunidone, glioblastoma 101/8, sensitizer, doxorubicin

Введение

Глиобластома - наиболее распространенное первичное злокачественное новообразование головного мозга у взрослых. Лечение больных глиобластомой включает оперативное удаление, лучевую терапию и химиотерапию. Химиотерапия злокачественных опухолей головного мозга сталкивается с рядом проблем, среди которых одна из наиболее значимых - необходимость проникновения через гематоэнцефалический барьер. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) осуществляет активное взаимодействие между кровотоком и ЦНС. Наличие такого барьера, с одной стороны, ограничивает транспорт из крови в мозг потенциально токсичных и опасных веществ, с другой - обеспечивает транспорт газов, питательных веществ к мозгу и удаление метаболитов. Физиологическая проницаемость ГЭБ уступает место патологической при различных видах патологии ЦНС (ишемия, гипоксия головного мозга, травмы и опухоли, нейродегенеративные заболевания), причем изменения проницаемости носят избирательный характер и зачастую являются причиной неэффективности фармакотерапии опухолей головного мозга [1]. Наличие гематоэнцефалического барьера в головном мозге создает большую проблему для доставки химиотерапевтических препаратов при астроцитоме, глиобластоме и других опухолях нейроэктодермального ряда. В отличие от опухолей оболочек мозга (менингиом) эти опухоли диагностируются на поздних стадиях, прорастают как в белое, так и в серое вещество головного мозга без развития болевого синдрома и плохо поддаются хирургическому лечению из-за затрудненного доступа и, как правило, множественных метастазов различного размера. Кроме того, помимо первичных опухолей именно в головном мозге обнаруживаются метастазы рака матки, молочной железы, меланомы и других опухолей.

Преодоление ГЭБ является стратегией повышения биодоступности и эффективности терапевтических средств против клеток глиобластомы. Разработка решения этой проблемы идет в двух направлениях: улучшение доставки лекарств в мозг за счет векторных систем [2] и улучшение проникновения лекарств в мозг. Улучшения проникновения лекарства в мозг можно достичь путем модификации либо самого препарата, либо влияя на степень проницаемости ГЭБ [3].

Препараты на основе полимеризованного гемоглобина обычно используются в качестве кровезаменителей с функцией переноса кислорода. Это такие препараты, как Геленпол и Биопюр. Кровезаменитель Геленпол представляет собой смесь тетрамера гемоглобина и олигомеров с различной длиной цепи, которые получены путем сшивания тетрамеров гемоглобина глутаровым альдегидом и модифицированы глутаминовой кислотой. Кровезаменитель фирмы Biopure получен из гемоглобина эритроцитов крупного рогатого скота, аналогичен по структуре Геленполу. Доставка кислорода, обеспечиваемая носителями O₂ на основе гемоглобина (Hb) (HBOC), рассматривается некоторыми авторами как многообещающая стратегия повышения эффективности химиотерапевтических препаратов для лечения солидных опухолей. Неоднородная плотность и проницаемость сосудов мозга наряду с наличием ГЭБ ограничивают применимость переносчиков O₂ при инфузии [4]. При оценке напряжения кислорода в эксперименте при глиосаркоме крысы 9L до и после внутривенного введения раствора полимеризованного бычьего гемоглобина было обнаружено, что ткань глиосаркомы в обычных условиях испытывает выраженную гипоксию. Введение раствора гемоглобина повышало степень оксигенации [5].

PolyHb модулирует доставку O₂ к гипоксическим (FME) и нормоксическим (LOX) ксенотрансплантатам меланомы человека мышам. Показано, что еженедельная инфузия PolyHb влияет на скорость роста, васкуляризацию и региональный кровоток в ксенотрансплантатах опухолей. Введение PolyHb приводила к увеличению оксигенации тканей, снижению кровотока, уменьшению роста опухоли и снижению васкуляризации в гипоксических опухолях. Эффективность инфузии PolyHb может определяться статусом опухоли [6]. С этой точки зрения опухоли мозга являются преимущественно гипоксическими, как и их микроокружение [7]. Для повышения качества жизни онкобольных и увеличения ее продолжительности предложено стимулировать эритропоэз путем введения гемоглобина, полученного по рекомбинантной технологии, извлекаемого из E.Coli, у которой экспрессирован ген гемоглобина, причем в этот ген введена мутация, обеспечивающая сшивание двух альфа- или двух бета- или нескольких альфа- и нескольких бета- субъединиц в тетрамер гемоглобина с помощью пептидного мостика [8]. Процесс стимуляции эритропоэза при введении в кровеносное русло обусловлен реакцией кроветворной системы по механизму положительной обратной связи на наличие внеэритроцитарного гемоглобина, что дополняет общую картину положительного эффекта введения полимеризованного гемоглобина онкобольным.

В качестве вероятного механизма можно рассматривать индукцию выброса из депо зрелых эритроцитов с последующей индукцией созревания незрелых проформ клеточных элементов крови. Экзогенный гемоглобин выполняет роль активатора индуцибельной гемоксигеназы-1 (HO-1), что приводит к повышению эндогенной продукции важнейшего низкомолекулярного медиатора – оксида углерода (CO), модулирующего сосудистый тонус, в том числе обеспечивая вазодилатацию сосудов, приводящих кровь к опухоли [9].

Оксид углерода (CO), которая в последние годы привлекает внимание исследователей, является эндогенным газообразным медиатором, который образуется в тканях млекопитающих как побочный продукт деградации гема, катализируемой ферментами гемоксигеназы (HO). Среди трех ферментативных изоформ гемоксигеназа-1 (HO-1) индуцируется в условиях окислительного стресса или повреждения тканей и играет полезную роль в механизме защиты от воспаления, ишемии/реперфузии (I/R) и многих других травм. Увеличение продукции эндогенного CO с помощью индуцируемой HO-1 его доставка с помощью новых фармакологических агентов, высвобождающих CO, или даже прямое вдыхание CO считается многообещающей альтернативой в будущих экспериментальных и клинических методах лечения различных патологий, включая онкозаболевания. Однако точные механизмы, лежащие в основе этих полезных действий, опосредованных CO, не полностью объяснены, требуется проведение дополнительных экспериментальных и клинических исследований эффектов индукторов эндогенного образования CO [10].

Кровезаменитель Крунидон на основе полимеризованного гемоглобина в дополнение к эффекту переноса кислорода, которым обладает полимеризованный гемоглобин, может реализовать эффекты также как индуктор образования эндогенного CO, индуктор эритропоэза и повышения эффективности клеточного дыхания. Кроме того, препарат является источником свободного железа, которое, поступая в значительном количестве в опухоль, может индуцировать ферроптоз. Ферроптоз является окислительной формой некротической гибели клеток, весьма актуальной для многих дегенеративных заболеваний и рака. Ферроптоз характеризуется железо-зависимым перекисным окислением липидов и отличается от других способов гибели клеток. Ключевым фактором ферроптоза является глутатионпероксидаза-4, которая эффективно контролирует перекисное окисление липидов. Разработка новых ингибиторов и индукторов ферроптоза открывает большой потенциал в разработке инновационных лекарств для лечения

заболеваний, ассоциированных с ферроптозом. Известно, что ионы железа способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, причем наибольшее количество железа после эритроцитов содержат клетки головного мозга. Важной из характеристик мультиформной глиобластомы является продуцирование значительного количества VEGF с увеличением количества сосудов, как правило, имеющих стадию несовершенного неоангиогенеза.

Крунидон (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий) состоит из гемоглобина полимеризованного крупного рогатого скота (2,0 г) и вспомогательных веществ. Введение Крунидона индуцирует расширение диаметра сосудов, в том числе артериол и капилляров вследствие образования эндогенного монооксида углерода [11]. Свойство кровезаменителя на основе гемоглобина полимеризованного модулировать вазодилатацию и вазоконстрикцию при химиотерапии позволяет повысить ее эффективность, обеспечивая повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Целью проведенного исследования было изучение эффекта введения Крунидона (полимеризованного гемоглобина) на эффективность химиотерапии доксорубицином глиобластомы крыс 101/8.

Материалы и методы

В исследовании была использована модель перевиваемой глиобластомы крысы 101/8 (Банк клеточных культур НИИ морфологии человека, Москва) на взрослых половозрелых крысах-самцах Wistar, самцы с массой тела 120-150 г. Животным проводили инъекцию препарата в хвостовую вену на 2, 5 и 8 сутки после имплантации опухоли (левую или правую). В группе комбинированной терапии препараты вводили последовательно в одну вену.

Крысы были разделены на четыре группы.

Группа 1. Контроль. Животным имплантировали глиобластому 101/8 и наблюдали за продолжительностью жизни. Терапию не проводили.

Группа 2. Доксорубицин. Животным с имплантированной глиобластомой проводили терапию водным раствором доксорубицина («Тева», Израиль) в дозе 1,5 мг/кг.

Группа 3. Крунидон. Животным с имплантированной глиобластомой проводили терапию раствором Крунидона в PBS в дозе 3 мг/кг.

Группа 4. «Крунидон+доксорубицин». Животным проводили комбинированную

терапию: доксорубицин в дозе 1,5 мг/кг и Крунидон в дозе 3 мг/кг.

Имплантицию глиомы 101/8 в мозг крысы проводили под кетамин-ксилазиновым (80 мг/кг, 20 мг/кг) наркозом тканью криоконсервированной или свежеизмельченной опухоли в количестве 800 тыс – 1 млн клеток. Для этого зубо-врачебной фрезой диаметром 2 мм в правой теменной кости черепа крысы на расстоянии 2 мм от сагиттального шва и 2 мм каудально от венечного шва делали отверстие. С помощью троакара диаметром 1,8 мм ткань опухоли вводили на глубину 4 мм от поверхности кости черепа, что соответствовало дну правого бокового желудочка. В случае необходимости кровотечение останавливали перекисью водорода. Рану засыпали порошком сульфамидных препаратов.

Исследуемые препараты вводили иммобилизованным крысам при помощи одноразового шприца в латеральную хвостовую вену. Иммобилизация животных проводилась в иммобилизационной плексигласовой камере Когана. Перед введением препарата хвост животного помещали на 2-3 мин в теплую (40°C) воду, высушивали его марлевой салфеткой и обтирали 70%-ным раствором этилового спирта. Придерживая основание хвоста левой рукой, в правую берут наполненный шприц. Тонкой иглой сначала прокалывали кожу на латеральной поверхности хвоста, а затем стенку сосуда. При попадании иглы в просвет вены в шприце появлялась кровь, и при движении поршня затем ощущался свободный ток жидкости.

Критерии оценки эффективности: увеличение продолжительности жизни (УПЖ) и средняя продолжительность жизни (СПЖ) крыс, получавших лечение (животных с интрацеребральной опухолью) по сравнению с интактным контролем и группой только с лечением доксорубицином. Статистическая обработка результатов исследований была проведена с применением параметрических и непараметрических методов. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

На гистологических срезах мозга крысы Вистар глиобластома 101/8 представлена злокачественной глиальной опухолью с высокой клеточностью, многочисленными митозами, очаговой микроваскулярной пролиферацией, обширными очагами некрозов и кровоизлияний. Сосуды в опухоли имели разный диаметр и форму, как правило, они были извитые, лакунообразно расширенные.

Эндотелиальная выстилка сосудов была очагово нарушена. Клетки опухоли имели высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Ядра плеоморфны, мелкого или среднего размера, с атипичным расположением гетерохроматина. Границы опухоли нечеткие, с выраженной инфильтрацией окружающей ткани мозга опухолевыми клетками. Капсула отсутствовала. По морфологической картине и по аналогии с опухолями человека данная опухоль соответствовала критериям ВОЗ для мультиформной глиобластомы/ астроцитомы IV степени.

Гибель животных после трансплантации глиомы в группе без лечения наступала на 14-21 сутки в результате распространения опухоли в ограниченном пространстве полости черепа. Все животные после терапии чувствовали себя удовлетворительно. При развитии опухолевого процесса отмечались следующие клинические признаки: животные теряют активность и аппетит, шерстный покров становится тусклым и взъерошенным, отмечаются другие признаки интоксикации. Животные в группе 1 и 3 стабильно прибавляли в весе до момента проявления симптомов глиобластомы (снижение веса за 2-3 дня до смерти, вялость, тремор, отказ от еды). Животные в группе 2 и 4 имели небольшую задержку прибавки в весе (отсутствие прибавки или легкое снижение веса) во время проведения терапии, что типично при терапии доксорубицином в данной дозе. В дальнейшем (начиная с 10 дня) прибавка в весе сохранялась до нарастания симптомов глиобластомы.

Вскрытие

У одного животного №3 из группы 4, забитого на 46-й день после имплантации опухоли из-за наступившего паралича задних конечностей не обнаружено опухолевого узла. Вероятная причина смерти – разрушение спинного мозга или перекрытие опухолевыми клетками спинномозгового канала. Все остальные животные, погибшие или забитые в результате нарастания симптомов развития глиобластомы, имели значительные опухолевые узлы в районе места подсадки (правое полушарие) со значительными кровоизлияниями. При вскрытии были обнаружены все типичные признаки смерти от кровоизлияния в результате развития глиобластомы. Животные №2 и №4 из группы 4, несмотря на окончания эксперимента, забиты не были, однако, признаков развития опухоли у них не было обнаружено. Эти животные считаются вылечившимися от глиобластомы, так как для данного штамма характерна 100% прививаемость.

Анализ продолжительности жизни животных

По результатам проведённой терапии проведён анализ выживаемости животных в

группах. На рисунке 1 показана кривая Каплана-Майера, позволяющая оценить эффект от проведенной терапии. В результате проведения комбинированной терапии в группе 4 показано значительное увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с остальными группами. Продолжительность жизни в группе 4 увеличилась на 231% (табл. 1), при этом 2 животных из 10 (20%) пережили порог наблюдения в 100 дней без проявления признаков роста опухоли. УПЖ в группе 4 по сравнению с группой 2 составило 160% (в таблице не представлено). Продолжительность жизни животных в группе 4 достоверно отличаются аналогичных показателей в группах 1, 2 и 3.

Таблица 1 - Средняя продолжительность жизни и увеличение продолжительности жизни животных после проведенной терапии

	Кол-во животных, n	СПЖ (M±SD)	Me	УПЖ к контролю, %	Достоверность разницы по Манну-Уиттн	
					К гр. 1 (Контроль)	К гр. 2. (Доксорубин)
Группа 1 Контроль	12	16,3±2,2	16		-	p<0,05
Группа 2 Доксорубин	9	20,7±7,1	18	27	p<0,05	-
Группа 3 Крунидон	6	15±4,2	13,5	-8	Не достоверно	p<0,05
Группа 4 Докс+Крунидон	10	54±31	48,5	231	p<0,01	p<0,01

Обозначения: M - среднее, SD - стандартное отклонение, Me - медиана, УПЖ - увеличение продолжительности жизни.

Продолжительность жизни животных из группы 3 сопоставима по срокам с показателями из группы 1, что позволяет предполагать, что Крунидон не имеет собственного противоопухолевого эффекта в отношении глиобластомы 101/8. Некоторое численное снижение продолжительности жизни в группе 3 по сравнению с группой 1 (-8%) статистически недостоверно и вызвано скорее гетерогенностью роста опухоли у животных, чем гипотетическим проопухолевым действием Крунидона, так как данные различия недостоверны.

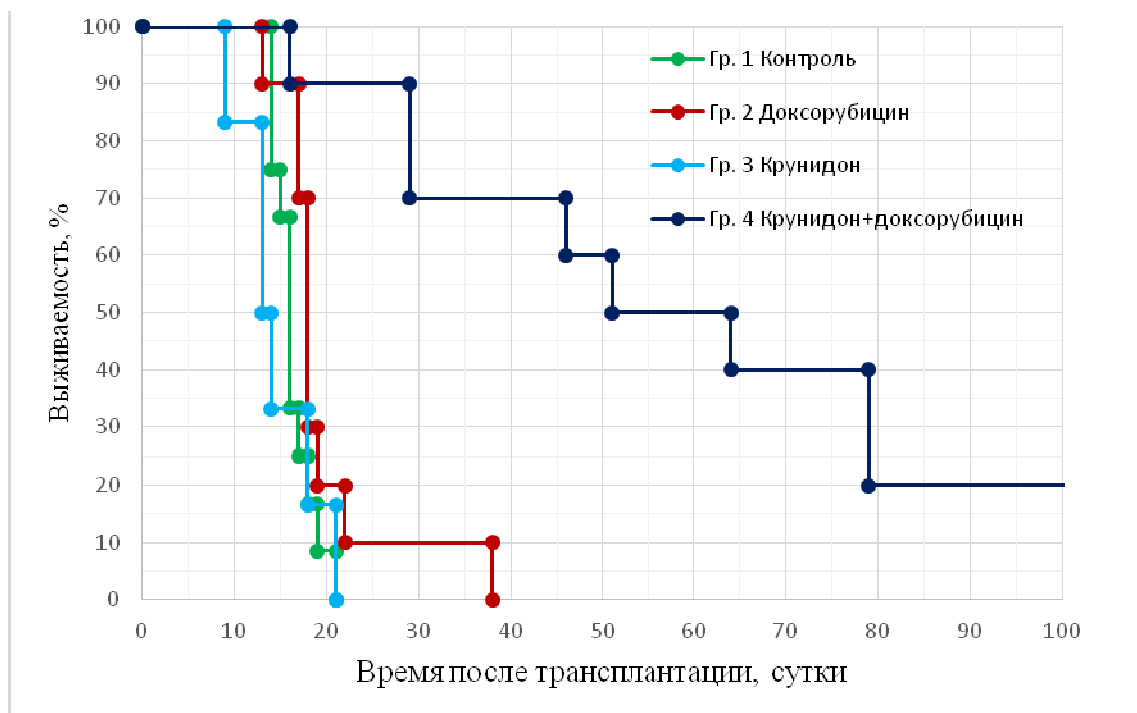


Рисунок 1 - Выживаемость животных с глиобластомой 101/8 после комбинированной терапии Крунидоном и доксорубицином.

Несмотря на то, что доксорубицин не проникает через ГЭБ в группе 2 обнаружено небольшое УПЖ - 18%. Данный эффект является типичным в заданных условиях и, вероятно, объясняется тем, что ГЭБ опухоли становится частично проницаемым к 3-й инъекции (8 день роста опухоли), и доксорубицин проникает в мозг и оказывает небольшой цитотоксический эффект.

В таблице приведены показатели СПЖ (средняя продолжительность жизни), УПЖ (увеличение продолжительности жизни) и медиана (Me) продолжительности жизни животных по четырем группам.

Таким образом, при введении полимеризованного гемоглобина при химиотерапии глиобластомы имеет место достоверный сенситизирующий эффект, усиливающий действие химиотерапевтического препарата. Введение только полимеризованного гемоглобина не оказывало достоверного эффекта на УПЖ и СПЖ крыс в эксперименте.

Заключение

Таким образом, внутривенная инфузия полимеризованного гемоглобина одновременно с химиотерапевтическим препаратом может способствовать повышению эффективности терапии в тех же дозах или снижению дозы химиотерапевтического препарата при сохранении эффективности и уменьшении побочных эффектов химиотерапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Begley D.J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther* 2004; 104: 1: 29—45.
2. Zou Y, Sun X, Yang Q, Zheng M, Shimoni O, Ruan W, Wang Y, Zhang D, Yin J, Huang X, Tao W, Park JB, Liang XJ, Leong KW, Shi B. Blood-brain barrier-penetrating single CRISPR-Cas9 nanocapsules for effective and safe glioblastoma gene therapy. *Sci Adv*. 2022 Apr 22;8(16):eabm8011. doi: 10.1126/sciadv.abm8011. Epub 2022 Apr 20. PMID: 35442747; PMCID: PMC9020780.
3. Ahmed MH, Canney M, Carpentier A, Idbaih A. Overcoming the blood brain barrier in glioblastoma: Status and future perspective. *Rev Neurol (Paris)*. 2023 Jun;179(5):430-436. doi: 10.1016/j.neurol.2023.03.013. Epub 2023 Apr 14. PMID: 37062676.
4. Belcher DA, Lucas A, Cabrales P, Palmer AF. Tumor vascular status controls oxygen delivery facilitated by infused polymerized hemoglobins with varying oxygen affinity. *PLoS Comput Biol*. 2020 Aug 20;16(8):e1008157. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008157. PMID: 32817659; PMCID: PMC7462268.
5. Teicher BA, Holden SA, Dupuis NP, Kusomoto T, Liu M, Liu F, Menon K. Oxygenation of the rat 9L gliosarcoma and the rat 13672 mammary carcinoma with various doses of a hemoglobin solution. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1994;22(3):827-33. doi: 10.3109/10731199409117917. PMID: 7994406.
6. Belcher DA, Lucas A, Cabrales P, Palmer AF. Polymerized human hemoglobin facilitated modulation of tumor oxygenation is dependent on tumor oxygenation status and oxygen affinity of the hemoglobin-based oxygen carrier. *Sci Rep*. 2020 Jul 9;10(1):11372. doi: 10.1038/s41598-020-68190-0. PMID: 32647211; PMCID: PMC7347553.
7. Chen Z, Han F, Du Y, Shi H, Zhou W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Feb 17;8(1):70. doi: 10.1038/s41392-023-01332-8. PMID: 36797231; PMCID: PMC9935926.
8. Патент США 5631219, A61K 038/16, 1997
9. Krukowska K, Magierowski M. Carbon monoxide (CO)/heme oxygenase (HO)-1 in gastrointestinal tumors pathophysiology and pharmacology - possible anti- and pro-cancer activities. *Biochem Pharmacol*. 2022 Jul;201:115058. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115058. Epub 2022 Apr 28. PMID: 35490732.
10. Korbit E, Brzozowski T, Magierowski M. Carbon Monoxide Being Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Molecular Sibling, as Endogenous and Exogenous Modulator of Oxidative Stress and Antioxidative Mechanisms in the Digestive System. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Apr 15;2020:5083876. doi: 10.1155/2020/5083876. PMID: 32377300; PMCID: PMC7180415.
11. Kourembanas S. Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Apr;4(2):291-9. doi: 10.1089/152308602753666343. PMID: 12006180.