



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ / MEDICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES

УДК 61:577.2

DOI: 10.15507/0236-2910.027.201701.093-107

НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА ДОКСОРУБИЦИНА С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННЫХ БИОСОВМЕСТИМЫХ НАНОВЕКТОРОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ

**А. В. Заборовский^{1*}, А. В. Кокорев², Е. П. Бродовская³,
С. А. Фирстов³, О. В. Минаева³, О. А. Куликов³,
Н. Н. Червякова³, В. Ю. Медвежонков³**

¹ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова Минздрава России
(г. Москва, Россия)

²Национальный исследовательский ядерный университет
«МИФИ» (г. Москва, Россия)

³ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (г. Саранск, Россия)

*azabor@mail.ru

Введение. В статье предложен метод получения конъюгата противоопухолевого химиопрепарата доксорубицина с экзогенной двухцепочечной ДНК осетровых рыб (источник – коммерческий препарат «Деринат»). Были подобраны оптимальные условия синтеза конъюгата (рН, температура и массовое соотношение компонентов), обеспечивающие наибольшую степень связывания химиопрепарата с носителем. Проведено исследование токсичности и специфической противоопухолевой активности синтезированного комплекса.

Материалы и методы. Синтез конъюгатов ДНК-доксорубицина проводили смешиванием раствора ДНК, водного раствора доксорубицина и фосфатного буфера. Смесь инкубировали 60 мин при постоянной температуре и непрерывном шейкере. Очистку конъюгата от невключившегося химиопрепарата проводили методом ультрафильтрации. Показатели токсичности препарата установлены на интактных мышцах в соответствии с принятыми стандартами. Противоопухолевая активность оценивалась по индексу торможения роста опухоли и индексу ингибирования метастазирования на мышцах с трансплантированной карциномой Льюис. Специфическая противоопухолевая активность была исследована в эквитоксических дозах препарата.

Результаты исследования. Было установлено, что при введении в эквитоксических дозах конъюгат обладает большей противоопухолевой активностью, чем водорастворимый препарат (на 35 % по объему опухоли и на 51 % по индексу торможения роста опухоли). Все исследованные формы, за исключением водорастворимого доксорубицина в дозе 0,5 LD₁₀, достоверно уменьшали количество метастазов опухоли в легкие. Метастазов в группах, получавших ДНК-конъюгированный препарат, было меньше, чем в группах, которым проводили лечение водным доксорубицином, однако эти различия не были статистически значимыми.

Обсуждение и заключения. Наиболее вероятным механизмом увеличения противоопухолевой активности доксорубицина при его конъюгации с ДНК является избирательное накопление химиопрепарата в опухолевой ткани, обусловленное эндоцитозом комплекса ДНК-доксорубицина.



Ключевые слова: доксорубин, противоопухолевый препарат, направленная доставка лекарств, ДНК-конъюгат, токсичность

Для цитирования: Направленная доставка доксорубина с помощью экзогенных биосовместимых нановекторов при экспериментальных неоплазиях / А. В. Заборовский [и др.] // Вестник Мордовского университета. 2017. Т. 27, № 1. С. 93–107. DOI: 10.15507/0236-2910.027.201701.092-107

TARGETED DELIVERY OF DOXORUBICIN BY EXOGENOUS BIOCOMPATIBLE NANOVEKTORS IN EXPERIMENTAL NEOPLASIA

A. V. Zaborovskiy^{1*}, A. V. Kokorev², Ye. P. Brodovskaya³,
S. A. Firstov³, O. V. Minayeva³, O. A. Kulikov³,
N. N. Chervyakova³, V. Yu. Medvezhonkov³

¹A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (Moscow, Russia)

²National Research Nuclear University MEPhI (Moscow, Russia)

³National Research Mordovia State University (Saransk, Russia)

*azabor@mail.ru

Introduction. The article presents the method of obtaining the conjugate of the anticancer chemotherapeutic agent doxorubicin with the exogenous double-stranded DNA of the sturgeons is proposed (the source: commercial drug “Derinat”). The optimal conditions for synthesis of conjugate (pH, temperature and the mass ratio of the components), ensuring the highest degree of binding the chemotherapeutic agent to a carrier, were picked out. The investigation of the toxicity and specific antineoplastic activity of the synthesized complex was conducted.

Materials and Methods. The synthesis of DNA-doxorubicin conjugates was performed by mixing of the aqueous DNA solution, phosphate buffer and aqueous doxorubicin solution. The mixture was incubated for 60 minutes at constant temperature and continuous shaking. Clearing of the conjugate from the non-encapsulated chemotherapeutic agent was made by ultrafiltration method. The performance of the drug toxicity was established on the intact mice in compliance with the accepted standards. The antineoplastic activity was evaluated upon the Tumor Growth Inhibition Index and Metastasis Inhibition Index in mice with the transplanted lung Lewis carcinoma (LLC). Specific anti-tumor activity was studied in the toxically equivalent doses of the drug.

Results. It is found that administered in the toxically equivalent doses conjugate has a higher antitumor activity than soluble drug (up to 35 % by volume of the tumor and 51 % by the index of tumor growth inhibition). It is found that all investigated forms except the water soluble doxorubicin 0,5 LD10, significantly reduced the number of tumor metastases in the lungs. The number of metastases in animals treated with DNA-conjugated drug was lower than in the animals that were treated with aqueous doxorubicin, but these differences were not statistically significant.

Discussion and Conclusions. The most probable mechanism of increasing antitumor activity of the DNA-conjugated doxorubicin is a selective accumulation of the drug in the tumor tissue, due to the endocytosis of the DNA complex.

Keywords: doxorubicin, anticancer drug, targeted drug delivery, DNA conjugate, toxicity



For citation: Zaborovskiy AV, Kokorev AV, BrodovskayaYeP, Firstov SA, Minayeva OV, Kulikov OA, Chervyakova NN, Medvezhonkov VYu. Targeted delivery of doxorubicin by exogenous biocompatible nanovectors in experimental neoplasia. *Vestnik Mordovskogo universiteta* = Mordovia University Bulletin. 2017; 1(27):93-107. DOI: 10.15507/0236-2910.027.201701.093-107

Введение

Повышение избирательности противоопухолевых химиотерапевтических агентов является одной из наиболее актуальных задач онкофармакологии. Наиболее распространенный путь ее решения – связывание цитостатического химиопрепарата с тем или иным вектором, который может обеспечить специфическое связывание с рецепторами на поверхности опухолевой клетки и последующий эндоцитоз. Наше внимание привлекла возможность использования в качестве такого вектора нативной экзогенной ДНК.

Обзор литературы

Известно, что экзогенная ДНК может фагоцитироваться клетками животных [1–8]. Установлено, что эндоцитоз ДНК имеет рецептор-опосредованный характер [2–6]. Этот механизм внутриклеточного проникновения ДНК был выявлен также для опухолевых клеток [7–8]. Данные факты послужили основанием для использования экзогенной ДНК в качестве вектора для направленной доставки противоопухолевых химиопрепаратов [9–12]. Однако в приведенных работах для синтеза конъюгата ДНК с доксорубицином (Докс) использовали не чистый химиопрепарат, а его комплекс с человеческими альбумином. Фактически альбумин выступал в роли линкера при связывании химиопрепарата с ДНК. Необходимо отметить, что в водной среде при температуре тела ДНК образует прочные комплексы только с катионными полимерами, а конъюгат с нативным альбумином, имеющим сравнимое количество анионных и катионных групп, является недостаточно стабильным [13–15]. Поскольку альбумин в условиях стресса может

достаточно интенсивно поглощаться клетками [16–17], в том числе опухолевыми [18], невозможно установить роль каждого из векторов в транспорте химиопрепарата, то ставит под сомнение необходимость использования ДНК. В связи с этим нами был разработан и апробирован метод синтеза конъюгата ДНК-Докс, не требующий использования альбумина.

Цель работы – разработка метода синтеза конъюгата противоопухолевого химиопрепарата доксорубицин с ДНК, исследование токсичности и специфической противоопухолевой активности синтезированного конъюгата.

Материалы и методы

Материалы

В работе были использованы следующие реактивы:

- ДНК-На (источник – коммерческий препарат «Деринат», ЗАО «Техномедсервис», Россия);
- доксорубицина гидрохлорид (Dox), > 98 % (Sigma-Aldrich, США);
- вода Milli-Q;
- фосфатный буфер (PBS) (Sigma-Aldrich, США);
- раствор Хенкса (ООО «Биолот», Россия).

Синтез конъюгатов ДНК-Докс

В стерильных условиях смешивали 2 мл раствора ДНК с содержанием субстанции 15 мг/мл, 2 мл водного раствора Докс с содержанием препарата 7,5, 10 или 15 мг/мл (в зависимости от серии) и 2 мл фосфатного буфера с pH 7.0 либо 8.0 (в зависимости от серии). Описание серий приведено в разделе «результаты». Смесь инкубировали 60 минут при постоянной температуре (4 °С, 20 °С и 37 °С) и непрерывном шейкировании. Полученный конъюгат очищали от свободного Докс методом

ультрафильтрации на оригинальной установке [19] с использованием целлюлозной мембраны Q1210-55 F3 («Orange scientific», Бельгия) с диаметром пор 12–14 кДа; продолжительность процедуры – 4 ч. Для каждого переменного параметра (рН, температура, соотношение реагентов) выполняли по 3 синтеза. Степень включения препарата в конъюгат рассчитывали по формуле:

$$\omega = (m_0 - m) / m_0 \cdot 100 \%,$$

где m_0 – исходное количество Докс, m – количество невключившегося Докс (рассчитывали по концентрации в ультрафильтрате).

Концентрацию препарата в ультрафильтрате определяли спектрофотометрически на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu (Япония) при длине волны 490 нм по предварительно построенному калибровочному графику.

Эксперименты на животных

Животные для исследования были получены из питомника «Столбовая» и содержались в стандартных условиях вивария. Эксперименты на животных проводились с соблюдением норм биоэтики после одобрения локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва».

Исследование острой токсичности

Исследование токсичности было выполнено на 240 белых мышах линии BALB. Животные были разделены на 4 группы (1 контрольную и 3 опытных). В контрольной группе животным внутривенно вводили 0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида. В 1-й опытной группе вводили внутривенно Докс; в 2-й – Докс, конъюгированный с ДНК; в 3-й – 1,5%-ный раствор ДНК. Внутри опытных групп было выделено по 6 подгрупп (в каждой 5 особей мужского пола и 5 – женского), в которых вводили препараты в дозах 2, 4, 8, 16, 24, и 32 мг/кг в пересчете на чистый Докс соответственно. Животные наблюдались в течение 30 дней,

ежедневно фиксировалась летальность. Определение показателей токсичности проводилось с помощью probit-analysis. Также были рассчитаны LD_{10} , LD_{50} и LD_{100} исследуемых субстанций и их 95%-ные доверительные интервалы.

Исследование противоопухолевой активности

Исследование противоопухолевой активности было проведено на 60 мышах обоего пола линии C57Bl/6. Противоопухолевую активность изучали на сингенной опухолевой системе из банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России – карциноме легкого Льюис (LLC).

Опухолевую ткань LLC трансплантировали животным внутримышечно в бедро задней лапки слева в количестве 1×10^6 клеток в растворе Хенкса. На 22-е сут. после трансплантации опухолевых клеток животные выводились из эксперимента.

Противоопухолевое и антиметастатическое действие оценивали в соответствии с методическими рекомендациями по изучению специфической активности противоопухолевых препаратов, действующими в РФ [20–21].

В процессе эксперимента определяли объем первичного опухолевого узла, а в конце эксперимента – его массу. Количество метастазов в легких подсчитывали после фиксации их в растворе Карнуа с помощью бинокулярной лупы МБС-9 (увеличение 16х). Размеры опухолей на месте трансплантации определяли с помощью штангенциркуля и рассчитывали их объем по формуле эллипсоида:

$$V = 0,131 \cdot L \cdot (D_1 + D_2)^2,$$

где L – длина опухоли; D_1 и D_2 – два взаимно перпендикулярных диаметра.

Инъекции препаратов производились внутривенно трехкратно с интервалом в 72 ч сут. начиная с 7-х сут. после перевивки штамма LLC. Выбор



доз был сделан на основе проведенных токсикологических исследований (сравнивались эквитоксические дозы). В 1-й и 3-й группах дозы препаратов

составили половину LD_{10} , во 2-й и 4-й – LD_{10} . Доза ДНК в 5-й группе соответствовало дозе в группе с высшей дозой конъюгата (табл. 1).

Таблица 1

Table 1

Схемы проводимой терапии
Schemes of the therapy

Группа / Group	N	Препарат / Drug	Доза / Dose	
			% от LD_{10}	mg
Контрольная / Control	10	–	–	–
1-я опытная / 1 st experimental	10	Водорастворимый Докс / Water solvable Dox	0,5 LD_{10}	2 mg/kg
2-я опытная / 2 nd experimental	10	Водорастворимый Докс / Water solvable Dox	LD_{10}	4 mg/kg
3-я опытная / 3 rd experimental	10	Конъюгат ДНК-Докс / DNA conjugated Dox	0,5 LD_{10}	6 mg/kg (Dox)
4-я опытная / 4 th experimental	10	Конъюгат ДНК-Докс / DNA conjugated Dox	LD_{10}	12 mg/kg (Dox)
5-я опытная / 5 th experimental	10	ДНК / DNA	–	7,5 mg/kg (DNA)

Противоопухолевую активность оценивали по индексу торможения роста опухоли (ИТРО), который рассчитывали по формуле:

$$\text{ИТРО} = (V_k - V_o) / V_k \cdot 100 \%,$$

где V_k и V_o – средний объем опухоли в контрольной и опытных группах соответственно.

Об антиметастатическом действии препаратов судили по следующим показателям.

1. Частота метастазирования опухоли – процент животных с метастазами по отношению к общему количеству животных в группе;

2. Среднее количество метастазов на одно животное в каждой группе.

3. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ):

$$\text{ИИМ} = ((A_k \cdot B_k) -$$

$$- (A \cdot B)) / A_k \cdot B_k \cdot 100\%,$$

где A_k и A – частота метастазирования в легкие у мышей контрольной и опытной групп; B_k и B – среднее количество метастазов в легких на одно животное в контрольной и опытной группах соответственно.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента и критерия хи-квадрат. Критический уровень значимости различий принимался равным 5 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования

Разработка метода синтеза конъюгата ДНК-Докс

Исследовано влияние концентрационных отношения ДНК-Докс, рН и температуры на эффективность связывания ДНК с Докс (табл. 2).

Таблица 2

Table 2

Эффективность связывания Докс ДНК при различных параметрах синтеза

Efficiency of doxorubicin-DNA conjugation at different synthesis parameters

pH	Массовое соотношение ДНК/Докс / Mass ratio DNA/Dox	Температура, °С / Temperature, °С	Степень конъюгации / Conjugation level	Содержание Докс (мг на 1 мг ДНК) / Dox contents (mg per 1 mg of DNA)
7,0	2:1	4	74 ± 3	0,37 ± 0,02
		21	64 ± 3	0,32 ± 0,01
		37	48 ± 4	0,24 ± 0,01
	3:2	4	71 ± 5	0,47 ± 0,02
		21	66 ± 4	0,44 ± 0,02
		37	61 ± 6	0,41 ± 0,03
	1:1	4	Комплекс нестабилен / Complex is unstable	
		21	42 ± 3	0,42 ± 0,01
		37	38 ± 4	0,38 ± 0,02
8,0	2:1	4	43 ± 5	0,22 ± 0,03
		21	39 ± 5	0,20 ± 0,03
		37	34 ± 6	0,17 ± 0,03
	3:2	4	44 ± 3	0,29 ± 0,01
		21	42 ± 4	0,28 ± 0,02
		37	38 ± 6	0,25 ± 0,03
	1:1	4	Комплекс нестабилен / Complex is unstable	
		21	32 ± 6	0,32 ± 0,03
		37	29 ± 5	0,29 ± 0,02



В кислой среде коллоидная система была нестабильной, в связи с чем исследовалась эффективность синтеза при нейтральном и слабощелочном значении рН. Из табл. 2 видно, что оптимальным для синтеза конъюгата является нейтральное значение рН, причем по мере понижения температуры степень включения Докс в конъюгат увеличивалась. Наибольшее содержание химиопрепарата на единицу массы носителя отмечалось при массовом соотношении ДНК/Докс 3:2. Таким образом, для синтеза конъюгата, использованного в данной работе, были выбраны следующие условия: рН = 7,0; температура 4 °С; массовое соотношение ДНК/Докс = 3:2. Последовательность операций синтеза описана выше.

Известно, что одним из главных механизмов противоопухолевого эффекта Докс является интеркаляция между нуклеотидами во время синтеза ДНК, что прерывает последний. В связи с этим возникает вопрос

о том, не будет ли потеряна активность препарата при взаимодействии с ДНК *in vitro*? Однако результаты ранее проведенных исследований [10–12], а также полученные в настоящей работе показывают, что Докс, связанный с экзогенной ДНК, сохраняет свою противоопухолевую активность. Этот феномен, видимо, объясняется тем, что в использованных условиях синтеза не происходит необратимого связывания Докс с нуклеотидами; данные связи с нуклеотидами в составе ДНК имеют не ковалентный, а водородный характер (средняя энергия связи – 4,9 ккал/моль) [22–23]. Фагоцитированные комплексы ДНК-Докс разрушаются эндонуклеазами, что сопровождается высвобождением химиопрепарата внутри клетки.

Исследование острой токсичности конъюгата ДНК-Докс

Результаты исследования острой токсичности Докс представлены в табл. 3–4.

Таблица 3

Table 3

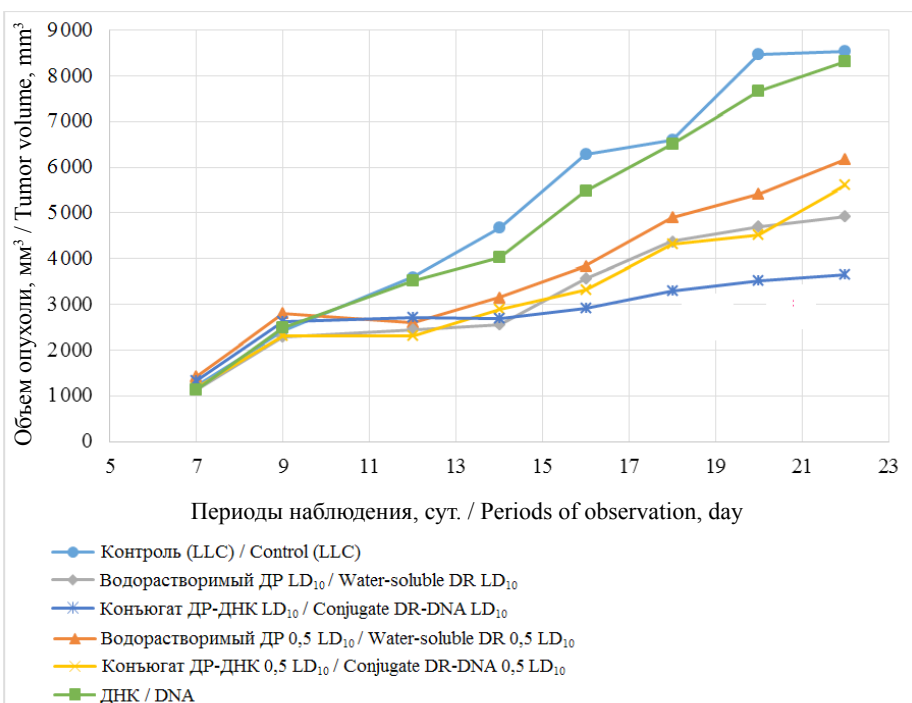
Летальность животных при введении различных лекарственных форм Докс
Lethality of animals when injecting different doxorubicin forms

Группа / Group	Исследуемая субстанция / Substance	Летальность (абс. %) в зависимости от дозы Докс, мг/кг / Lethality (abs %) depending on dose of Dox, mg/kg					
		2	4	8	16	24	32
1	Водорастворимый Докс / Water solvable Dox	0	1	3	7	10	10
2	Конъюгат ДНК-Докс / DNA-Dox conjugate	0	0	2	5	8	10
3	ДНК / DNA	0	0	0	0	0	0

Показатели острой токсичности различных лекарственных форм Докс
Acute toxicity markers for different doxorubicin forms

Показатели / Markers	Водный раствор Докс / Water solution of Dox		Конъюгат ДНК-Докс / DNA-Dox conjugate	
	Доза, мг / Dose, mg	U ₉₅ *	Доза, мг / Dose, mg	U ₉₅ *
1	2	3	4	5
LD ₁₀	4,4	2,1–6,4	6,2	2,7–9,0
LD ₅₀	9,9	7,1–13,4	14,6	10,5–19,9
LD ₁₀₀	43,9	27,7–118,2	69,5	41,1–256,8

Примечание: * – 95%-ный доверительный интервал / Note: * – 95% confidence interval



Р и с у н о к. Динамика объема опухоли в группах (* – достоверное отличие объема опухоли в группе водорастворимого Докс от аналогичного показателя в группе ДНК-конъюгированного Докс в дозе LD₁₀)

F i g u r e. Dynamics of tumor volume in groups. For all groups except the group treated with DNA, the tumor volume is significantly different from that of the control group starting from the 14th day.

* – significant difference in tumor volume in the group of water-soluble Dox and the group of DNA conjugated Dox in LD₁₀ doses)



Из табл. 4 видно, что токсические дозы конъюгата в среднем в 1,5 раза выше по сравнению с водорастворимым Докс. Причиной снижения токсичности может быть неполная диссоциация конъюгата в соматических клетках, меньшее накопление в миокарде, а также ингибирование прооксидантного эффекта Докс нуклеиновой кислотой. Учитывая, что уменьшение токсично-

сти может сопровождаться снижением специфической противоопухолевой активности химиопрепарата, для дальнейшего исследования были использованы эквитоксические дозы химиопрепарата.

Исследование противоопухолевой активности

Результаты оценки объема опухоли представлены на рисунке; индекс торможения роста опухоли – в табл. 5.

Таблица 5

Table 5

Значения индекса торможения роста опухоли в группах
The values of Tumor Growth Inhibition Index (TGII) in the groups

Группы животных / Groups of animals	Значения ИТРО на этапах наблюдения / Values of the TGII at various stages						
	9 сут. / 9 th day	12 сут. / 12 th day	14 сут. / 14 th day	16 сут. / 16 th day	18 сут. / 18 th day	20 сут. / 20 th day	22 сут. / 22 th day
Водорастворимый Докс 0,5 LD ₁₀ / Water-soluble doxo- rubicin, 0,5 of LD ₁₀	-15,9	27,5	32,7	38,9	25,7	36,0	27,9
Конъюгат ДНК- Докс 0,5 LD ₁₀ / DNA-Dox conjuga- te, 0,5 of LD ₁₀	4,1	35,7	38,1	47,4	34,7	46,6	34,3
Водорастворимый Докс LD ₁₀ / Water- soluble Dox, LD ₁₀	5,0	32,1	45,4	43,2	33,7	42,4	44,1
Конъюгат ДНК- Докс LD ₁₀ / DNA- Dox conjugate, LD ₁₀	-8,7	24,3	42,7	53,6	50,0	64,0	67,4
ДНК / DNA	-3,4	2,1	13,8	12,8	1,5	9,6	2,6

Видно, что на фоне химиотерапии происходило торможение роста опухоли во всех группах животных. На 14-е сут. наблюдения появились статистически значимые различия в объеме

опухоли между контрольной и всем опытными группами. Между опытными группами достоверных различий в данных показателях не было зарегистрировано до 20-х сут. наблюде-

ния. На 20-е и 22-е сут. объем опухоли в группе, получавшей ДНК-конъюгированный Докс, в дозе LD_{10} , был меньше аналогичного показателя в группе, получавшей водорастворимый Докс на 34,3 и 35,0 % ($p < 0,05$ для обеих точек). Для этой дозы разница по ИТРО между группой ДНК-Докс и группой водораств-

воримого Докс на 20 и 22 сут. составляла 14,1 и 15,0 процентных пунктов (или 50,9 и 52,8 %) соответственно.

Аналогичная тенденция отмечалась также для групп животных, получавших препарат в дозе $0,5 LD_{10}$, однако статистически эти различия подтверждены не были.

Таблица 6

Table 6

Результаты оценки антиметастатической активности
Results of antimetastatic activity investigation

Группы животных / Groups of animals	Масса опухоли на 22-е сут., г ($M \pm \sigma$) / Tumor mass on the 22nd day, g ($M \pm \sigma$)	Частота метастазирования % / Frequency of metastases, %	Среднее число поверхностных метастазов ($M \pm \sigma$) / Average number of metastases on the surface ($M \pm \sigma$)	Индекс ингибирования метастазирования / Metastasis Inhibition Index
Контрольная (без лечения) / Control (no treatment)	$8,8 \pm 2,9$	100	$94,7 \pm 4,2$	–
Водорастворимый Докс, $0,5 LD_{10}$ / Water-soluble doxorubicin, $0,5$ of LD_{10}	$6,4 \pm 2,1$	100	$71,2 \pm 6,9$	24,8
Конъюгат ДНК-Докс, $0,5$ LD_{10} / DNA-Dox conjugate, $0,5 LD_{10}$	$5,8 \pm 2,4$	100	$65,3 \pm 11,2$	31,0
Водорастворимый Докс, LD_{10} / Water-soluble doxo- gubicin, LD_{10}	$5,1 \pm 2,2$	90	$44,5 \pm 12,1$	57,7
Конъюгат ДНК-Докс, LD_{10} / DNA-Dox conjugate, LD_{10}	$4,1 \pm 1,8$	80	$35,6 \pm 9,8$	69,9
ДНК / DNA	$8,6 \pm 3,1$	100	$90,2 \pm 8,5$	4,8

Примечание: полужирный шрифт – достоверные отличия от контрольной группы / Note: bold is significant differences from the control group



При оценке антиметастатической активности было установлено, что все исследованные формы, за исключением водорастворимого Докс в дозе 0,5 LD₁₀, достоверно снижали количество метастазов опухоли в легкое. Число метастазов в группах, получавших ДНК-конъюгированный препарат, было меньше, чем в группах, которым проводили лечение водным Докс, однако эти различия не были статистически значимыми. Наиболее вероятным механизмом увеличения противоопухолевой активности Докс при его конъюгации с ДНК является избирательное накопление химиопрепарата в опухолевой ткани, обусловленное эндцитозом комплекса ДНК-Докс.

Обсуждение и заключения

В результате исследования был предложен метод получения конъюгата противоопухолевого химиопрепарата Докс с экзогенной двухцепочечной ДНК; проведено исследование токсичности и специфической противоопухолевой активности синтезированного комплекса; показано, что токсичность конъюгата ниже, чем у свободного Докс (LD₅₀ были равны 14,6 мг/кг и 9,9 мг/кг для конъюгата и Докс соответственно). Введение в эквитоксических дозах конъюгата обладает большей противоопухолевой активностью, чем водорастворимый препарат (максимум на 35 % по объему опухоли и на 51 % по ИТРО).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Lamers M. C., De Groot E. R., Roos D. Phagocytosis and degradation of DNA-anti-DNA complexes by human phagocytes. I. Assay conditions, quantitative aspects and differences between human blood monocytes and neutrophils // *Eur. J. Immunol.* 1981. Vol. 11 (10). P. 757–764. DOI: 10.1002/eji.1830111005
2. Receptor-Mediated Endocytosis and Nuclear Transport of a Transfecting DNA Construct / A. A. Rosenkranz [et al.] // *Experimental cell research.* 1992. Vol. 199. P. 323–329. DOI: 10.1016/0014-4827(92)90441-A
3. Guy J., Drabek D., Antoniou M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy // *Mol. Biotechnol.* 1995. Vol. 3. P. 237–248. DOI: 10.1007/BF02789334
4. Таргетный транспорт противоопухолевых химиопрепаратов: современные технологии и перспективы развития / Н. А. Пятаев [и др.] // *Поволжский онкологический вестник.* 2012. № 2. С. 60–71. URL: <http://elibrary.ru/item.asp?id=18903294>
5. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process / V. Budker [et al.] // *J. Gene. Med.* 2000. Vol. 2. P. 76–88. DOI: 10.1002/(SICI)1521-2254(200003/04)2:2<76::AID-GM97>3.0.CO;2-4
6. Kensuke M., Masahiro O. Endocytosis-free DNA sensing by cell surface TLR9 in neutrophils: Rapid defense with autoimmune risks // *Eur. J. Immunol.* 2013. Vol. 43. P. 2006–2009. DOI: 10.1002/eji.201343882
7. Witttrup A., Belting M. Characterizing peptide-mediated DNA internalization in human cancer cells // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 480. P. 101–112. DOI: 10.1007/978-1-59745-429-2_7
8. Orava E. W., Cicmil N., Gariépy J. Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2010. Vol. 1798. P. 2190–2200. DOI: 10.1016/j.bbame.2010.02.004
9. Comparative study in mice of the toxicity, pharmacology, and therapeutic activity of daunorubicin-DNA and doxorubicin-DNA complexes / D. Deprez-de Campeneere [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1979. Vol. 2. P. 25–30. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Deprez-De+Campeneere+D.%2C+Baurain+R%2C+Huybrechts+M+and+Trouet+A+%2F%2F>
10. Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics / G. Zhu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. Vol. 110 (20). P. 7998–8003. DOI: 10.1073

11. Особенности тканевого распределения и противоопухолевой активности доксорубина при введении в форме конъюгата с ДНК у крыс с трансплантированной карциномой PC-1 / Н. А. Пятаев [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. 2011. № 10 (2). P. 55–59. URL: <http://elibrary.ru/item.asp?id=18884986>
12. Эффективность ДНК-конъюгированных форм доксорубина и цисплатина при холангиоцеллюлярной карциноме у крыс / Н. А. Пятаев [и др.] // Фундаментальные исследования. 2014. № 10-5. P. 959–963. URL: <https://www.fundamental-research.ru/pdf/2014/10-5/35773.pdf>
13. **Fried M. G., Bromberg J. L.** Factors that affect the stability of protein-DNA complexes during gel electrophoresis // Electrophoresis. 1997. Vol. 18, no. 1. P. 6–11. DOI: 10.1002/elps.1150180103
14. Effect of Albumin and Polyanion on the Structure of DNA Complexes with Polycation Containing Hydrophilic Nonionic Block / D. Oupický [et al.] // Bioconjugate Chem. 1999. Vol. 10 (5). P. 764–772. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502341>
15. Cationized human serum albumin as a non-viral vector system for gene delivery? Characterization of complex formation with plasmid DNA and transfection efficiency / D. Fischer [et al.] // Int. J. Pharm. 2001. Vol. 225. P. 97–111. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489558>
16. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis / A. Wunder [et al.] // J. Immunol. 2003. Vol. 170. P. 4793–4801. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=16.%09Albumin-based+drug+delivery+as+novel+therapeutic+approach+for+rheumatoid+arthritis>
17. Native albumin for targeted drug delivery / E. Neumann [et al.] // Expert Opin. Drug Deliv. 2010. Vol. 7. P. 915–925. DOI: 10.1517/17425247.2010.498474
18. **Frei E.** Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells // Diabetology and Metabolic Syndrome. 2011. Vol. 1. P. 3–11. DOI: 10.1186/1758-5996-3-11
19. Пат. на полезную модель 154660 (РФ), МПК B01D61/14; B01D63/16; B01D61/18. Устройство для ультрафильтрации жидкостей / Н. А. Пятаев [и др.]. Оpubл. 26.11.2014. URL: <http://elibrary.ru/item.asp?id=23929187>
20. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. П. У. Хабриева. Москва : Медицина, 2005. 832 с. URL: <http://www.booksmed.com/farmakologiya/275-rukovodstvo-po-yeksperimentalnomu-doklinicheskomu.html>
21. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова. Москва : Гриф и К^о, 2012. Ч. 1. 944 с. URL: <http://www.regmed.ru/Content/Page.aspx?id=30e5e2b2-74a6-4616-9624-b796f00d0a9b>
22. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications / D. Agudelo [et al.] // International journal of biological macromolecules. 2014. Vol. 66. P. 144–150. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.028
23. New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction / C. Pérez-Arnaiz [et al.] // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 118 (5). P. 1288–1295. DOI: 10.1021/jp411429g

Поступила 18.01.2017; принята к публикации 23.02.2017; опубликована онлайн 31.03.2017

Об авторах:

Заборовский Андрей Владимирович, доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова Минздрава России (127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1), кандидат медицинских наук, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7923-9916>**, azabor@mail.ru

Кокорев Александр Викторович, заведующий кафедрой физиологии медицинского факультета ИАТЭ Обнинского филиала Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (249030, Россия, г. Обнинск, Студгородок 1), кандидат медицинских наук, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3316-1639>**, kav2972@yandex.ru

Бродовская Екатерина Павловна, аспирантка кафедры анестезиологии и реаниматологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1060-9843>**, kitten77@mail.ru



Фирстов Сергей Александрович, аспирант кафедры анестезиологии и реаниматологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1961-7708>**, surgeonruz@yandex.ru

Минаева Ольга Владимировна, доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68), кандидат медицинских наук, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6154-3434>**, polinanev@mail.ru

Куликов Олег Александрович, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68), кандидат медицинских наук, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4411-677X>**, oleg-kulikov-84@mail.ru

Червякова Наталья Николаевна, ассистентка кафедры анестезиологии и реаниматологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68), кандидат медицинских наук, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7904-3948>**, zurn-natalya@yandex.ru

Медвежонков Вячеслав Юрьевич, аспирант кафедры нормальной и патологической анатомии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4373-6566>**, medvejonkov.v@gmail.com

Вклад соавторов: А. В. Заборовский: анализ данных литературы, синтез конъюгатов ДНК-Докс, исследование острой токсичности конъюгата ДНК-Докс, исследование противоопухолевой активности конъюгата ДНК-Докс, статистическая обработка данных, написание текста статьи; А. В. Кокорев: анализ данных литературы, синтез конъюгатов ДНК-докс, исследование противоопухолевой активности конъюгата ДНК-Докс, написание текста статьи; Е. П. Бродовская: исследование острой токсичности конъюгата ДНК-Докс, исследование противоопухолевой активности конъюгата ДНК-Докс; С. А. Фирстов: перевивка опухоли, исследование противоопухолевой активности конъюгата ДНК-Докс; О. В. Минаева: анализ данных литературы, исследование острой токсичности конъюгата ДНК-Докс, статистическая обработка данных, написание текста статьи; О. А. Куликов: перевивка опухоли, исследование противоопухолевой активности конъюгата ДНК-Докс; Н. Н. Червякова: исследование острой токсичности конъюгата ДНК-Докс, исследование противоопухолевой активности конъюгата ДНК-Докс; В. Ю. Медвежонков: исследование острой токсичности конъюгата ДНК-Докс.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

REFERENCES

1. Lamers MC, De Groot ER, Roos D. Phagocytosis and degradation of DNA-anti-DNA complexes by human phagocytes. I. Assay conditions, quantitative aspects and differences between human blood monocytes and neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 1981; 11(10):757-764. DOI: 10.1002/eji.1830111005
2. Rosenkranz AA, Yachmenev SV, Jans DA, Serebryakova NV, Muravev VI, Peters R, et al. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct. *Experimental Cell Research.* 1992; 199:323-329. DOI: 10.1016/0014-4827(92)90441-A
3. Guy J, Drabek D, Antoniou M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol. Biotechnol.* 1995; 3:237-248. DOI: 10.1007/BF02789334
4. Pyatayev NA, Myeltsayev GG, Skopin PI, Minayeva OV, Shchukin SA. Targetnyy transport protivopukholevykh khimioterapevtov: sovremennyye tekhnologii i perspektivy razvitiya [Targeted transport of anticancer chemotherapeutic agents: modern technology and development prospects]. *Povolzhskiy onkologicheskiiy vestnik = Volga Cancer Bulletin.* 2012; 2:60-71. Available from: <http://elibrary.ru/item.asp?id=18903294> (In Russ.)
5. Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J. Gene. Med.* 2000; 2:76-88. DOI: 10.1002/(SICI)1521-2254(200003/04)2:2<76::AID-JGM97>3.0.CO;2-4

6. Kensuke M, Masahiro O. Endocytosis-free DNA sensing by cell surface TLR9 in neutrophils: Rapid defense with autoimmune risks. *Eur. J. Immunol.* 2013; 43:2006-2009. DOI: 10.1002/eji.201343882
7. Witttrup A, Belting M. Characterizing peptide-mediated DNA internalization in human cancer cells. *Methods Mol. Biol.* 2009; 480:101-112. DOI: 10.1007/978-1-59745-429-2_7
8. Orava EW, Cicmil N, Gariépy J. Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2010; 1798:2190-2200. DOI: 10.1016/j.bbame.2010.02.004
9. Deprez-De Campeneere D, Baurain R, Huybrechts M, Trouet A. Comparative study in mice of the toxicity, pharmacology, and therapeutic activity of daunorubicin-DNA and doxorubicin-DNA complexes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1979; 2:25-30. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Deprez-De+Campeneere+D.%2C+Baurain+R%2C+Huybrechts+M+and+Trouet+A+%2F%2F>
10. Zhu G, Zheng J, Song E, Donovan M, Zhang K, Lue C, et al. Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanostrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(20):7998-8003. DOI: 10.1073/pnas.1220817110
11. Pyatayev NA, Skopin PI, Minayeva OV, Shchukin SA, Korovina YeYu, Zyrnyayeva NN. Osobennosti tkanevogo raspredeleniya i protivopukholevoy aktivnosti doksorubitsina pri vvedenii v forme konyugata s DNK u krysa s transplantirovannoy kartsinomoy RS-1 [Features and tissue distribution Dox antitumor activity when administered in the form of a conjugate with DNA in rats with transplanted carcinoma RS-1]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapeutic.* 2011; 10(2):55-59. Available from: <http://elibrary.ru/item.asp?id=18884986> (In Russ.)
12. Pyatayev NA, Minayeva OV, Zyrnyayeva NN, Kokorev AV, Gurevich KG, Zaborovskiy AV. Efektivnost DNK-konyugirovannykh form doksorubitsina i tsisplatina pri kholangiotsellyulyarnoy kartsinome u krysa [Efficiency of DNA-conjugated forms of doxorubicin and cisplatin in rats with cholangiocellular carcinoma RS-1]. *Fundamentalnye issledovaniya.* 2014; 10(5):959-963. Available from: <https://www.fundamental-research.ru/pdf/2014/10-5/35773.pdf> (In Russ.)
13. Fried MG, Bromberg JL. Factors that affect the stability of protein-DNA complexes during gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1997; 18(1):6-11. DOI: 10.1002/elps.1150180103
14. Oupický D, Konák C, Dash PR, Seymour LW, Ulbrich K. Effect of Albumin and Polyanion on the Structure of DNA Complexes with Polycation Containing Hydrophilic Nonionic Block. *Bioconjugate Chem.* 1999; 10(5):764-772. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502341>
15. Fischer D, Bieber T, Brüsselbach S, Elsässer H, Kissel T. Cationized human serum albumin as a non-viral vector system for gene delivery? Characterization of complex formation with plasmid DNA and transfection efficiency. *Int. J. Pharm.* 2001; 225:97-111. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489558>
16. Wunder A, Müller-Ladner U, Stelzer EH, Funk J, Neumann E, Stehle G, et al. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 2003; 170:4793-4801. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=16.%09Albumin-based+drug+delivery+as+novel+the+rapeutic+approach+for+rheumatoid+arthritis>
17. Neumann E, Frei E, Funk D, Becker MD, Schrenk HH, Müller-Ladner U, et al. Native albumin for targeted drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2010; 7: 915-925. DOI: 10.1517/17425247.2010.498474
18. Frei E. Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells. *Diabetology and Metabolic Syndrome.* 2011; 1:3-11. DOI: 10.1186/1758-5996-3-11
19. Pyatayev NA, et al. Pat. na poleznuyu model [Utility patent] 154660 (RF), MPK B01D61/14; B01D63/16; B01D61/18. Ustroystvo dlya ultrafiltratsii zhidkostey [Apparatus for ultra filtration of liquids]. *Publ.* 2014; no. 26 Available from: <http://elibrary.ru/item.asp?id=23929187> (In Russ.)
20. Khabriyev RU, editor. Rukovodstvo po eksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Moscow: Meditsina; 2005. Available from: <http://www.booksmed.com/farmakologiya/275-rukovodstvo-po-yeksperimentalnomu-doklinicheskomu.html> (In Russ.)
21. Mironov AN. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Moscow: Grif i Ko Publ.; 2012. Available from: <http://www.regmed.ru/Content/Page.aspx?id=30e5e2b2-74a6-4616-9624-b796f00d0a9b> (In Russ.)



22. Agudelo D, Bourassa P, Bérubé G, Tajmir-Riahi HA. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *International journal of biological macromolecules*. 2014; 66:144-150. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.028

23. Pérez-Arnaiz C, Busto N, Leal JM, García B. New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction. *J. Phys. Chem. B*. 2014; 118(5):1288-1295. DOI: 10.1021/jp411429g

Submitted 18.01.2017; revised 23.02.2017; published online 31.03.2017

About the authors:

Andrey V. Zaborovskiy, Associated Professor of Chair of Pharmacology, Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (20 bd. 1 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russia), Ph.D. (Medicine), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7923-9916>**, azabor@mail.ru

Aleksandr V. Kokorev, Head of Chair of Physiology, Medical Faculty, Obninsk Branch of National Research Nuclear University (1 Studgorodok, Obninsk 249030, Russia), Ph.D. (Medicine), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3316-1639>**, kav2972@yandex.ru

Yekaterina P. Brodovskaya, Postgraduate Student, Chair of Anesthesiology and Rheumatology, National Research Mordovia State University (68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Russia), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1060-9843>**, kitten77@mail.ru

Sergey A. Firstov, Postgraduate Student, Chair of Anesthesiology and Rheumatology, National Research Mordovia State University (68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Russia), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1961-7708>**, surgeonruz@yandex.ru

Olga V. Minayeva, Associated Professor of Chair of Anesthesiology and Rheumatology, National Research Mordovia State University (68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Russia), Ph.D. (Medicine), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6154-3434>**, polinanew@mail.ru

Oleg A. Kulikov, Associated Professor of Chair of Pharmacology and Clinical Pharmacology with a course of Pharmaceutical Technology, National Research Mordovia State University (68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Russia), Ph.D. (Medicine), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4411-677X>**, oleg-kulikov-84@mail.ru

Natalya N. Chervyakova, Associated Professor of Chair of Anesthesiology and Rheumatology, National Research Mordovia State University (68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Russia), Ph.D. (Medicine), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7904-3948>**, zyrn-natalya@yandex.ru

Vyacheslav Yu. Medvezhonkov, Postgraduate Student, Chair of Normal and Pathological Anatomy, (68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Russia), **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4373-6566>**, medvejonkov.v@gmail.com

Contribution of the co-authors: A. Zaborovskiy reviewed relevant literature, synthesized DNA-Dox conjugates, investigated the acute toxicity of DNA-Dox conjugates and antitumor activity of DNA-Dox conjugate, processed statistics, wrote the draft; A. Kokorev analyzed literary sources, synthesized DNA-Dox conjugates, investigated the antitumor activity of DNA-Dox conjugates, wrote the draft; Ye. Brodovskaya investigated the acute toxicity of DNA-Dox conjugates and antitumor activity of DNA-Dox conjugates; S. Firstov transplanted tumors, investigated the antitumor activity of the conjugate DNA Docks; O. Minayeva analyzed literary data, investigated the acute toxicity of DNA-Dox conjugate, processed statistics, wrote the draft; A. Kulikov transplanted tumors, investigated the antitumor activity of DNA-Dox conjugate; N. Chervyakova investigated the acute toxicity of DNA-Dox conjugate and anti-tumor activity of DNA-Dox conjugate; V. Medvezhonkov investigated the acute toxicity of DNA-Dox conjugate.

All authors have read and approved the final manuscript.