

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФИЦ ФТМ,

академик РАН

М.И. Воевода

2024 г.



**«Исследование противоопухолевой активности  
низкомолекулярного хитозана на моделях перевиваемых  
экспериментальных опухолей in vivo»**

Договор на выполнение научно-исследовательских работ № 02/24 от 05.02.2024 г.

Руководитель исследования, к.м.н.

Троицкий А.В. Троицкий

«16» апреля 2024 г.

Ответственный исполнитель исследования, к.б.н.

Князев Р.А. Князев

«16» апреля 2024 г.

Новосибирск 2024

### **Актуальность**

Проблема онкологии в XXI веке является самым приоритетным направлением современной медицины. Это обусловлено не только стремительным ростом числа вновь выявляемых онкологических заболеваний, которые тесно связаны с ухудшающейся экологической обстановкой, особенно в крупных городах, но также фактической стагнацией фармацевтического рынка противоопухолевых препаратов. Причин этому несколько. Во-первых, надо отдать должный приоритет современной биотехнологии, которая сделала доступными методы ранней диагностики онкологических заболеваний основанные на выявлении специфических иммунобиологических маркеров опухолевого роста. Это привело к тому, что численность пациентов на ранних стадиях развития злокачественных опухолей резко возросла, при этом классической онкологической симптоматики с нарушением функции внутренних органов у таких пациентов практически не наблюдается. У таких пациентов также отсутствуют, как правило, показания к хирургическому вмешательству, поскольку опухолевая ткань на ранних стадиях не имеет четких границ, и речь может идти даже о нескольких сотнях опухолевых клеток, которые в перспективе могут дать организованную на уровне тканей злокачественную опухоль с показаниями для ее хирургического удаления. Казалось бы, в этой ситуации применение противоопухолевых препаратов является весьма удачным способом лечения, однако практически это не совсем так. В частности как более 50 лет назад, так и сейчас доминирующим способом лечения, независимо от стадии, злокачественных опухолей является химиолучевая терапия. И в этом кроется главная проблема современной онкологии. Дело в том, что основные противоопухолевые препараты относятся к группе цитостатиков, которые останавливают пролиферацию опухолевых клеток и приводят к их гибели за счет цитотоксического действия и терминального нарушения клеточного метаболизма. Практически все применяемые в онкологии цитостатики не обладают селективностью в отношении опухолевых клеток, они также приводят к гибели нормальные клетки нашего организма, которые обладают высоким пролиферативным потенциалом. Это, прежде всего, клетки костного мозга. Поэтому главным побочным действием практически всех цитостатиков является миелосупрессия на уровне костного мозга, что приводит к сильному снижению уровня лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови. Лейкопения и эритропения в свою очередь ведут к гипоксии тканей всех внутренних органов и головного мозга, а также

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

критичному снижению иммунобиологической резистентности к инфекциям. Именно поэтому онкологические больные подвержены различным инфекциям и дистрофическим изменениям в тканях внутренних органов (печени, почек и т.д.) включая периферическую и центральную нервную системы. Именно поэтому классическими осложнениями химиотерапии опухолей являются: генерализованные инфекции по типу сепсиса, фиброз внутренних органов, прежде всего печени, сердца и почек, а также энцефалопатия. Все эти осложнения химиотерапии опухолей создают существенную угрозу для жизни онкологических больных, так как носят необратимый характер на фоне сниженного иммунитета. Чем чаще и интенсивнее проводятся курсы химиотерапии, тем больше начинают проявляться ее побочные эффекты. Конечно, были попытки компенсировать цитостатическую миелосупрессию и снизить побочное действие цитостатиков. Например, в конце XX века на фармацевтическом рынке появился генно-инженерный эритропоэтин, который даже от одной инъекции мог восстановить нормальный уровень гемоглобина и эритроцитов при химиотерапии цитостатиками, однако этот метод не получил широкого распространения, так как он постепенно истощал физиологические ресурсы костного мозга и со временем его эффективность падала. Значительно сложнее обстоит ситуация с падением лейкоцитов при химиотерапии опухолей, так как селективных препаратов для стимуляции лейкопоза практически нет, а существующие стимуляторы лейкопоза (иммуностимуляторы) параллельно стимулируют и пролиферацию опухолевых клеток. Ярким примером являются витаминные препараты и препараты на основе биоактивных пептидов (Т-активин, пирогенал, продигозан и др.). По-прежнему единственно эффективным методом восстановления уровня эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови после химиотерапии является переливание крови, однако этот метод дает только кратковременный эффект и, к сожалению, также может также стимулировать рост опухолевой ткани за счет иммуностимуляции вследствие иммунобиологической несовместимости компонентов крови. И теперь стоит вновь вернуться к ранней диагностике опухолей. Итак, ранняя диагностика опухолей, не подразумевает хирургического вмешательства, но ориентирует на проведение химиотерапии цитостатиками. И вот здесь кроется вторая проблема современной онкологии. Дело в том, осложнения от применения цитостатиков весьма значительные и вдобавок к этому они сами по себе являются мутагенными препаратами, то есть они сами способны вызвать в клетках организма человека, особенно обладающих высокой

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

функциональной, метаболической и пролиферативной активностью, изменения на уровне генома клеток, с появлением низкодифференцированных форм, подобных клеткам опухолевой ткани. Поэтому с точки зрения прогноза противоопухолевой терапии индекс риск осложнений химиотерапии/ терапевтическая эффективность близок к единице, однако, несмотря на это сейчас придерживаются тактики ранней химиотерапии, ориентируясь на увеличение продолжительности жизни онкологических больных, хотя качество жизни таких, учитывая серьезные побочные эффекты цитостатиков, остается на низком уровне. Мы не останавливаемся на радиотерапии злокачественных опухолей, но она имеет близкие побочные эффекты, также связанные с угнетением кроветворения и иммуносупрессией.

Безусловно, поиски эффективных противоопухолевых препаратов с высокой селективностью ведутся постоянно. Тем не менее, они до настоящего времени не увенчались каким-либо значимым успехом. Кратко остановимся на некоторых из таких современных подходов. Прежде всего, это моноклональные антитела к опухолям. Современная биотехнология позволяет создавать фармацевтические препараты на основе моноклональных антител практически к любым злокачественным опухолям. Такие препараты выпускаются, но их терапевтическая эффективность оставляет желать лучшего, так как все опухолевые клетки за счет низкой дифференцировки обладают низкой иммуногенной активностью и моноклональные антитела, селективно фиксируясь на поверхности клеток злокачественных опухолей, практически не активируют клеточное звено иммунитета (макрофаги и цитотоксические Т-лимфоциты). В результате высокая селективность моноклональных антител не сопряжена с высоким индексом подавления пролиферации опухолевых клеток. Сейчас активно ведется поиск решения этой проблемы. Одним из таких вариантов является использование селективных факторов стимуляции клеточного звена иммунитета, к которым можно отнести полисахариды и, в частности, хитозан. Из цитостатических препаратов есть перспектива использования комплексных соединений рутения вместо соединений платины. У них значительно меньшая цитотоксичность, но при этом также снижена противоопухолевая активность. Исследования в этом направлении интенсивно ведутся во многих научных медицинских центрах мира. Фотодинамическая терапия, несмотря на высокую селективность, ограничена в основном наружными опухолями и мало приемлема при онкологических процессах во внутренних органах. В любом случае в современной онкологии не решена

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

главная проблема противоопухолевой терапии – это высокая селективность в отношении опухолевых клеток и высокая в отношении них цитотоксичность в сочетании с низкой токсичностью в отношении нормальных клеток.

Еще в 60-е годы XX столетия в Японии был разработан противоопухолевый препарат Лентинан, который в качестве активного вещества содержал  $\beta$ -1-3 гликаны, выделенные из базидиального гриба *Lentinus edodes*. Надо отметить, что это была первая и очень удачная попытка, использовать в терапии злокачественных новообразований вместо цитостатиков естественные физиологические системы нашего организма, в частности клеточное звено иммунитета, представленное макрофагами и цитотоксичными Т-лимфоцитами. Надо подчеркнуть, что это принципиально новое решение, которое на первый взгляд идет вразрез с существующими тенденциями разработки противоопухолевых препаратов, однако этот препарат в Японии выпускается до настоящего времени и очень популярен в онкологических клиниках. Конечно, у  $\beta$ -1-3 гликанов полностью отсутствует самостоятельная противоопухолевая активность, они никоим образом не влияют непосредственно на пролиферацию опухолевых клеток, однако опосредованное действие на них через клеточное звено иммунитета – это как раз адекватное решение проблемы современной онкологии - высокая селективность, низкая токсичность и терапевтическая эффективность. Более того Лентинан оказался весьма эффективным препаратом в комплексной химиотерапии злокачественных опухолей в комбинации с классическими цитостатиками, так как его иммуностимулирующее действие направлено избирательно на клеточное звено иммунитета. В результате Лентинан стимулирует лейкопоз и компенсирует снижение уровня лейкоцитов в периферической крови при использовании классических цитостатиков. Благодаря этому он повышает иммунобиологическую резистентность к инфекциям у больных, получающих курс химиотерапии цитостатиками. Таким образом  $\beta$ -1-3 гликаны Лентинана устраняют основные побочные эффекты цитостатиков. Если учесть, что у  $\beta$ -1-3 гликанов присутствует антиоксидантная, антиишемическая и противовоспалительная активность за счет выработки комплекса цитокинов активированными макрофагами, то становится очевидным перспективность этого направления в онкологической практике. Пожалуй, единственным недостатком Лентинана является его высокая стоимость и необходимость вводить внутривенно, так как энтеральная биодоступность у него практически отсутствует из-за высокой молекулярной массы (свыше 400 кДа). Поэтому последние десятилетия в

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

мировых научных медицинских центрах велся поиск эффективных заменителей грибных  $\beta$ -1-3 гликанов. Одним из наиболее перспективных кандидатов на эту роль был хитозан, который является природным полисахаридом, в котором в качестве мономера выступает глюкозамин. Надо сказать, что хитозану в настоящее время посвящено огромное число научных работ, и более того, уже существует на рынке биологически активных пищевых добавок много продуктов, содержащих этот полисахарид. По иммуностимулирующей активности он практически идентичен  $\beta$ -1-3 гликанам, однако у него есть еще дополнительно антимикробные свойства (бактериостатические и фунгистатические) и способность связывать (сорбировать) различные токсические вещества, от эндогенных токсинов до ионов тяжелых металлов, радионуклидов. Казалось бы, эффективный заменитель  $\beta$ -1-3 гликанов найден и можно приступать к его детальному изучению на экспериментальных моделях злокачественных опухолей. Однако его применению препятствует его весьма значительный положительный заряд за счет первичных аминогрупп глюкозамина. При pH более 6,5 первичные аминогруппы теряют свой заряд и его высокая растворимость в воде, обусловленная положительным зарядом, резко снижается. Уже при pH 7,0 растворимость хитозана настолько снижена, что он выпадает в осадок. Таким образом, в среде тонкого кишечника, где pH среды 8,0 – 8,2 растворы хитозана теряют свою коллоидную стабильность и хитозан выпадая в осадок становится классическим нерастворимым пищевым волокном, у которого отсутствует какая-либо специфическая биологическая активность, кроме усиления перистальтики тонкого кишечника. Разнообразные попытки химически модифицировать и получить производные хитозана стабильные при щелочных значениях pH не увенчались успехом и продолжаются в настоящее время. Однако решение этой проблемы было найдено специалистами ООО «Инновационные технологии здоровья». Им удалось за счет уникальной технологии программируемой гидратации получить растворимые комплексы низкомолекулярного хитозана и создать на их основе энтеросорбент «Эко-Элемент». Энтеросорбент «Эко-Элемент» представляет собой сбалансированную композицию гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана с микронизированным гидрогелем высокомолекулярного хитозана. В этом продукте гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана выполняют роль  $\beta$ -1-3 гликанов и стимулируют клеточное звено иммунитета (за счет рецептор опосредованной активации макрофагов), а микронизированный гидрогель хитозана выполняет функцию депонирования

низкомолекулярных комплексов в сочетании с высокой сорбционной емкостью в отношении различных токсинов, поступающих с пищей в тонкий кишечник. Именно такой продукт может представлять интерес для современной онкологии, так как в нем сочетаются антимикробные, сорбционные и иммуностимулирующие свойства хитозана.

Целью настоящего исследования была оценка онкопротективной эффективности гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана, как основного биологически активного компонента энтеросорбента «Эко-Элемент», а также оценка его терапевтической эффективности на экспериментальных моделях злокачественных опухолей *in vivo* и оценка биофармацевтических свойств *in vitro*.

### **Материалы и методы**

В данном эксперименте в качестве переносимой опухоли использовали лимфосаркому мыши RLS 40, изначально устойчивую к циклофосфану, которая была получена из лимфосаркомы LS путем многократных перевивок рецидивов этой опухоли, возникающих после воздействия низких доз циклофосфана при их постепенном повышении (10–200 мг/кг) [1,2,3]. В клинике опухоль RLS может соответствовать опухоли пациентов, которая формируется после нескольких проведенных курсов химиотерапии. Опухоль LS в свою очередь ранее была получена у мышей линии СВА путем однократной инъекции нитрозометилмочевины и проявляла высокую чувствительность к действию циклофосфана, который является основным компонентом большинства схем химиотерапии [1–4].

1. Kaledin V. I. Studying of efficiency mono- and polychemotherapy on model intertwined mouse lymphosarcoma, tolerant to apoptosis induction / V. I. Kaledin, H. A. Popova, E. M. Andreyeva // Questions of oncology. — 2006. — V. 52, № 1. — P. 70-73.
2. Cyclophosphamide as induced apoptosis of mouse cells of lymphosarcoma in the conditions *in vivo* / V. I. Kaledin, V. P. Nikolin, T. A. Ageeva [etc.] // Questions of oncology. — 2000. V. 46, № 5. — P. 588-593.
3. Animal model of drug-resistant tumor progression / N. Mironova, O. Shklyayeva, E. Andreeva [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 1091. — P. 490–500.

4. Participation of *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* and *bcl-2* genes in formation of stability of cages RLSi lymphosarcoma at mice to therapeutic action of cyclophosphan / E. M. Andreeva, N. L. Mironova, O. A. Shklyayeva [etc.] // Bulletin of NSU. Series: Biology, clin. medicine.— 2006. — V. 4, iss. 1. — P 21-26.

#### *Дизайн эксперимента*

Эксперимент проводили на двух формах асцитных опухолей и одной солидной форме. Для формирования асцитной опухоли 25 мышам линии balb/c с массой тела 18-24 г внутрибрюшинно была перевита лимфосаркома мышей RLS 40 и 24 мышам линии balb/c с массой тела 18-24 г внутрибрюшинно была перевита карцинома Кребс-2. Пассаж проводили в количестве  $1,4 \times 10^6$  опухолевых клеток/особь в физиологическом растворе в объёме 0,5 мл.

Мыши для лимфосаркомы мышей RLS 40 были разделены на 3 группы. Первая группа (контрольная), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня через день в течение 14 дней вводили внутрибрюшинно 0,1 мл физиологического раствора. Динамику увеличения массы тела (интегральная по группе) за счет асцитного эксудата оценивали на 7 и 14 сутки после пассажа опухолевых клеток. Вторая группа (опытная 1, оценка онкопротективного действия), 9 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня через день в течение 14 дней вводили внутрибрюшинно 0,1 мл 0,85% раствора гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана. Динамику увеличения массы тела (интегральная по группе) за счет асцитного эксудата оценивали на 7 и 14 сутки после пассажа опухолевых клеток. Третья группа (опытная 2, оценка терапевтического действия), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная с 7 дня через день в течение 7 дней вводили внутрибрюшинно 0,1 мл 0,85% раствора гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана. Динамику увеличения массы тела (интегральная по группе) за счет асцитного эксудата оценивали на 7 и 14 сутки после пассажа опухолевых клеток.

Мыши для карциномы Кребс-2 были разделены на 3 группы. Первая группа (контрольная), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня через день в течение 14 дней вводили внутрибрюшинно 0,1 мл физиологического раствора. Динамику увеличения массы тела (интегральная по группе) за счет асцитного эксудата оценивали на 7 и 14 сутки после пассажа опухолевых клеток. Вторая группа (опытная 1,



ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

оценка онкопротективного действия), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня через день в течение 14 дней вводили внутривентриально 0,1 мл 0,85% раствора гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана. Динамику увеличения массы тела (интегральная по группе) за счет асцитного экссудата оценивали на 7 и 14 сутки после пассажа опухолевых клеток. Третья группа (опытная 2, оценка терапевтического действия), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная с 7 дня через день в течение 7 дней вводили внутривентриально 0,1 мл 0,85% раствора гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана. Динамику увеличения массы тела (интегральная по группе) за счет асцитного экссудата оценивали на 7 и 14 сутки после пассажа опухолевых клеток

Для формирования солидной опухоли 22 аутбредным (нелинейным) лабораторным мышам ICR (CD-1) была перевита лимфосаркома мышей RLS 40. Пассаж проводили во внешнюю верхнюю часть правого бедра в количестве  $1 \times 10^6$  опухолевых клеток/особь в физиологическом растворе в объеме 0,1 мл. Все мыши были разделены на 3 группы. Первая группа (контрольная), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня, через день в течение 28 дней вводили внутривентриально 0,1 мл физиологического раствора. Динамику изменения массы тела (интегральная по группе) оценивали на 7,14 и 28 сутки после пассажа опухолевых клеток. Массу и объем солидной опухоли определяли на 28 сутки после эвтаназии (дислокация шейных позвонков) и экстирпации. Вторая группа (опытная 1, оценка онкопротективного действия), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня через день в течение 28 дней вводили внутривентриально 0,1 мл 0,85% раствора гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана. Динамику изменения массы тела (интегральная по группе) оценивали на 7,14 и 28 сутки после пассажа опухолевых клеток. Массу и объем солидной опухоли определяли на 28 сутки после эвтаназии мышей (дислокация шейных позвонков) и экстирпации опухоли. Третья группа (опытная 2, оценка терапевтического действия), 6 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная с 7 дня через день в течение 21 дня вводили внутривентриально 0,1 мл 0,85% раствора гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана. Динамику изменения массы тела оценивали (интегральная по группе) на 7,14 и 28 сутки после пассажа опухолевых клеток. Массу и объем солидной опухоли определяли на 28 сутки после эвтаназии мышей (дислокация шейных позвонков) и экстирпации опухоли.

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

### Результаты

В таблице 1 представлены результаты исследования онкопротективного и терапевтического действия гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана на экспериментальной модели лимфосаркомы мыши RLS 40 (асцитная форма).

**Таблица 1**

Группа/Дата	14.02	21.02	28.02
Вес контрольной группы, г (8 особей) Физиологический раствор в/б 0,1 мл на мышь	175,18	186,09 <b>+1,36/мышь</b>	234,68 <b>+6,1/мышь</b>
Вес опытной группы 1, г (9 особей) в/б 0,1 мл 0,85% раствора хитозана на мышь ч/з день	202,7	184,01 <b>-2,08/мышь</b>	169,86 <b>+0,8/мышь</b>
Вес опытной группы 2, г (8 особей) 1-я неделя – физиологический раствор в/б 0,1 мл на мышь, 2-я неделя – в/б 0,1 мл 0,85% раствора хитозана на мышь ч/з день	178,09	188,28 <b>+1,2/мышь</b>	211,62 <b>+2,9/мышь</b>

Как видно из представленных результатов гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана обладают отчетливым онкопротективным действием на модели лимфосаркомы мыши RLS 40 (асцитная форма). После перевивания опухолевых клеток динамика прироста массы тела за счет асцитной жидкости более низкая, чем у животных контрольной группы. Близкая динамика наблюдается и у животных опытной группы 2, когда гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана начинали вводить со 2 недели. На момент окончания эксперимента динамика прироста массы тела за счет асцитной жидкости также была ниже, чем у животных контрольной группы.

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

Полученные данные свидетельствуют о потенциальном терапевтическом действии гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана на модели лимфосаркомы мыши RLS 40 (асцитная форма). Следует отметить, что эта модель опухоли резистентна к циклофосфану, поэтому можно рассматривать гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана в качестве перспективного вспомогательного средства в комплексной терапии злокачественных опухолей при полихимиотерапии цитостатиками.

В таблице 2 представлены результаты исследования онкопротективного и терапевтического действия гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана на экспериментальной асцитной карциноме Кребса-2. Как видно из представленных результатов онкопротективное действие гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана на модели асцитной карциномы Кребса-2 несколько ниже (опытная группа 1), чем на модели лимфосаркомы мыши RLS 40 (асцитная форма), однако терапевтическое действие более выражено (опытная группа 2).

**Таблица 2**

Группа/Дата	14.02	21.02	28.02
Вес контрольной группы, г (8 особей) Физиологический раствор в/б 0,1 мл на мышь	223,61	265,65 <b>+5,26/мышь</b>	173,15 <b>+1,4/мышь</b>
Вес опытной группы 1, г (8 особей) в/б 0,1 мл 0,85% раствора хитозана на мышь ч/з день	226,43	264,06 <b>+4,7/мышь</b>	179,71 <b>+2,9/мышь</b>
Вес опытной группы 2, г (8 особей) 1-я неделя – физиологический раствор в/б 0,1 мл на мышь, 2-я неделя – в/б 0,1 мл 0,85% раствора хитозана на мышь ч/з день	224,41	281,81 <b>+ 7,18/мышь</b>	177,32 <b>+0,24/мышь</b>

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

В таблице 3 и 4 представлены результаты исследования онкопротективного и терапевтического действия гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана на экспериментальной модели солидной формы лимфосаркомы мыши. Как видно из представленных результатов гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана обладают выраженным онкопротективным действием на экспериментальной модели солидной формы лимфосаркомы мыши. Объем и вес солидной опухоли в опытной группе 1 почти в два раза ниже, чем в контрольной группе. Терапевтический эффект от применения гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана на данной модели не отчетливо выражен, чем на асцитных моделях злокачественных опухолей что может быть связано с особенностями низкой васкуляризации солидных опухолей.

**Таблица 3**

Группа/Дата	14.02	21.02	28.02	04.03
Вес контрольной группы, г (8 особей)  Физиологический раствор в/б 0,1 мл на мышь	229,77	255,73 <b>+3,25/мышь</b>	283,58 <b>+3,48/мышь</b>	302,57 <b>+2,4/мышь</b>
Вес опытной группы 1, г (8 особей)  в/б 0,1 мл 0,85% раствора хитозана на мышь ч/з день	234,23	264,78 <b>+3,82/мышь</b>	277,31 <b>+1,57/мышь</b>	285,12 <b>+ 1,0/мышь</b>
Вес опытной группы 2, г (6 особей)  1-я неделя – физиологический раствор в/б 0,1 мл на мышь, 2-я неделя – в/б 0,1 мл 0,85% раствора хитозана на мышь ч/з день	172,77	203,82 <b>+5,18/мышь</b>	213,53 <b>+1,62/мышь</b>	229,21 <b>+2,6/мышь</b>

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

**Таблица 4**

<b>Контрольные мыши</b>				
Вес здоровой лапки, г	Вес лапки с опухолью, г	Вес опухоли, г	Размеры опухоли см	Объем опухоли см <sup>3</sup>
1,53	5,22	3,69	1,2 x 2,2 x 1,6	2,212
1,29	3,68	2,39	1,2 x 1,7 x 1,2	1,282
1,39	3,17	1,78	1,3 x 1,5 x 1,4	1,429
1,22	3,93	2,71	1,4 x 1,9 x 1,3	1,811
1,29	7,02	5,73	2,1 x 2,4 x 1,9	5,014
1,46	2,9	1,44	1,6 x 1,6 x 1,2	1,609
1,28	5,58	4,3	1,7 x 2,2 x 1,9	3,721
1,4	4,2	2,8	1,7 x 2,2 x 1,6	3,133
		<b>3,105±1,4</b>		<b>2,53±0,47</b>
<b>Опыт 1 (оценка онкопротективного действия)</b>				
1,25	2,26	1,01	1,2 x 1,5 x 1,0	0,942
1,39	3,44	2,05	1,6 x 1,7 x 1,1	1,567
1,15	1,17	0,02	1,7 x 1,0 x 0,6	0,534
1,38	3,0	1,62	1,5 x 1,2 x 1,1	1,037
1,10	4,21	3,11	1,8 x 1,7 x 1,5	2,403
1,42	4,5	3,08	1,4 x 1,8 x 1,4	1,847
1,27	3,15	1,88	1,7 x 1,4 x 1,1	1,371
1,55	4,4	2,85	1,7 x 1,8 x 1,5	2,403
		<b>1,952±1,08</b>		<b>1,51±0,24</b>

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

<b>Опыт 2 (оценка терапевтического действия)</b>				
1,32	3,5	2,18	1,9 x 1,7 x 1,2	2,029
1,27	4,05	2,78	1,8 x 1,7 x 1,2	1,923
1,35	6,34	4,99	2,3 x 1,9 x 1,5	3,432
1,33	5,2	3,87	1,8 x 1,4 x 1,4	1,847
1,4	4,18	2,78	2,0 x 1,7 x 1,4	2,492
1,4	5,3	3,9	2,0 x 1,6 x 1,5	2,513
		<b>3,417±1,03</b>		<b>2,37±0,25</b>

### **Выводы**

Как показали проведенные исследования гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана обладают выраженным онкопротективным действием и их можно рассматривать в качестве перспективных средств торможения роста злокачественных опухолей. В связи с тем, что гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана обладают способностью компенсировать цитостатическую миелосупрессию, то их можно рассматривать в качестве перспективных вспомогательных средств при проведении полихимиотерии злокачественных опухолей.

## **II. Оценка способности гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана оказывать гепатопротекторные свойства при моделировании окислительного стресса *in vitro*.**

### **2. Материалы и методы.**

Для эксперимента использовали крысы линии Wistar массой 180 г. Эксперименты на лабораторных животных проводили в соответствии с «Правилами работ с

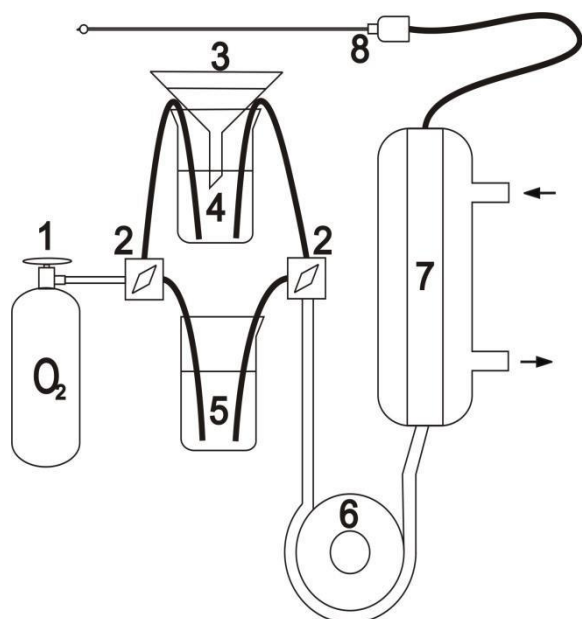
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 №755 и приложение к приказу № 565 от 04.10.1977), с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000). Животные содержались на стандартной диете и имели свободный доступ к воде. Представленная работа одобрена комитетом по биоэтике ФИЦ ФТМ.

Для этого крысу, находящуюся под легким эфирным наркозом декапитировали, фиксировали на хирургическом столике и открывали брюшную стенку, и канюлировали *v. hepatica*. Эта процедура занимала не более 1 минуты. Процедура получения гепатоцитов и суспензии непаренхимных клеток включала четыре основных этапа: (1) перфузия печени *in situ* раствором Хэнкса без  $Ca^{2+}$  для отмывки органа от крови (2) рециркуляционная перфузия печени *in vitro* раствором коллагеназы для протеолитического переваривания соединительной ткани; (3) механическая дезагрегация ткани; (4) дифференциальное центрифугирование при 50g для получения осадка очищенных гепатоцитов [Lee S.M.L. et al., 2014].

### **2.1 Перфузия печени *in situ* раствором Хэнкса без $Ca^{2+}$**

Сразу же после введения канюли *v. hepatica* начинали перфузию раствором Хэнкса без  $Ca^{2+}$  со скоростью 15 мл/мин для свободного оттока перфузата из печени надрезали *v. porta*. Через 8-10 мин, не прерывая перфузию, печень осторожно отпрепаровывали, извлекали из тела и присоединяли к замкнутой перфузирующей системе (рис. 1) , состоящей из термостатируемой колонки, ультратермостата (УТ-4, Польша), камеры для печени, перистальтического насоса (Zalimp-304, Польша), микрочайки для регистрации рН, баллона с кислородом.



Обозначения:

1. Источник кислорода;
2. Переключатели;
3. Воронка с пористым дном для размещения печени после экстирпации на этапе циркуляторной перфузии;
4. Емкость с Раствором 2;
5. Емкость с Раствором 1;
6. Перистальтический насос;
7. Обратный холодильник;
8. Игла.

Рис. 1 Перфузионная система

## 2.2 Рециркуляционная перфузия печени *in vitro* раствором коллагеназы

На этом этапе печень перфузировали в режиме рециркуляции бикарбонатным раствором Рингера-Кребса с  $\text{Ca}^{2+}$ , содержащим 0,03% коллагеназы (рН 7,4). В течение всего периода перфузии через растворы пропускали газовую смесь (95%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$ ), поддерживали рН 7,4 и  $t$  37° С. Скорость прокачивания раствора регулировали перистальтическим насосом из расчета 5 мл/мин на 1 г. ткани. Для ферментативного переваривания межклеточной ткани было достаточно 20-30 мин непрерывной перфузии. О полноте переваривания судили по набуханию органа и разрыву глиссоновой капсулы (Seglen P.O., 1976). После этого печень переносили в термостатируемую чашку Петри и с помощью шпателя отделяли клетки от глиссоновой капсулы и сосудов. Полученную суспензию клеток разбавляли до 50 мл бикарбонатным раствором Рингера-Кребса, содержащем 0,03% коллагеназы, и инкубировали 10 мин в термостате (37°С) при постоянном покачивании.

## 2.3 Механическая дезагрегация ткани

Все процедуры на данном этапе выполняли при 4°С. Суспензию дважды фильтровали через марлевую сетку для отделения недиссоциированных кусочков ткани, клеточных агрегатов и остатков соединительной ткани.

## 2.4 Получения осадка очищенных гепатоцитов



**ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»**

Из фильтрата, представляющего собой смешанную клеточную суспензию, с помощью центрифугирования при 50g выделяли гепатоциты. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по включению трипанового синего (Гольдберг Е.Д. и др., 1992). Чистоту клеточных фракций оценивали с помощью световой микроскопии.

### **2.5 Подсчет клеток**

Клеточную суспензию отмывали, центрифугировали, надосадок сливали, к осадку добавляли 3 мл среды. Затем брали 100 мкл суспензии добавляли 400 мкл. среды и 500 мкл. краски.

Суспензию клеток помещаем в камеру Горяева и считаем. После подсчета клетки наносили на 24-е планшеты в количестве 250 тыс. на лунку и инкубировали 24 часа в культуральной среде без добавок. (Первые сутки клетки восстанавливались после выделения).

### **3. Дизайн исследования**

Через 24 часа после восстановления моделировали окислительный стресс, для этого в культуральную среду добавляли перекись водорода в концентрации 100 мкМ. Планшеты с перекисью водорода случайным образом делили на группы:

1. Контроль – в культуральную среду добавляли физиологический раствор в объеме 20 мкл.
2. Хитозан (гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана) – 10 мкг/мл - в культуральную среду добавляли Хитозан в концентрации 10 мкг/мл;
3. Хитозан (гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана) – 50 мкг/мл - в культуральную среду добавляли Хитозан в концентрации 50 мкг/мл;
4. Хитозан (гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана) – 100 мкг/мл - в культуральную среду добавляли Хитозан в концентрации 100 мкг/мл.

Клетки с добавками инкубировали 24 часа.

За час до окончания эксперимента проводили процедуру окрашивания на каспазы 3/7, используя флуоресцентный маркер CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermofisher, США). Для этого культуральную среду, содержащую добавки удаляли и наносили среду без Хитозана, содержащую краситель CellEvent™ Caspase-3/7 (краситель разбавляли в 500 раз) и инкубировали при 37С в течение 30 мин. Затем среда с красителем

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

удалялась и клетки промывали дважды PBS. Далее клетки фиксировали 4% формалином и проводили оценку методом флуоресцентной микроскопии.

По результатам оценки, клетки, излучающие зеленый свет, считаются апоптотическими, клетки без свечения – живыми. Данные обсчитаны на 100 клеток в поле и выражены в %.

На рисунках 1-4 представлены данные флуоресцентной микроскопии. Показано, что количество светящихся клеток отличается. В группах с Хитозаном их визуально меньше по сравнению с Контрольной группой.

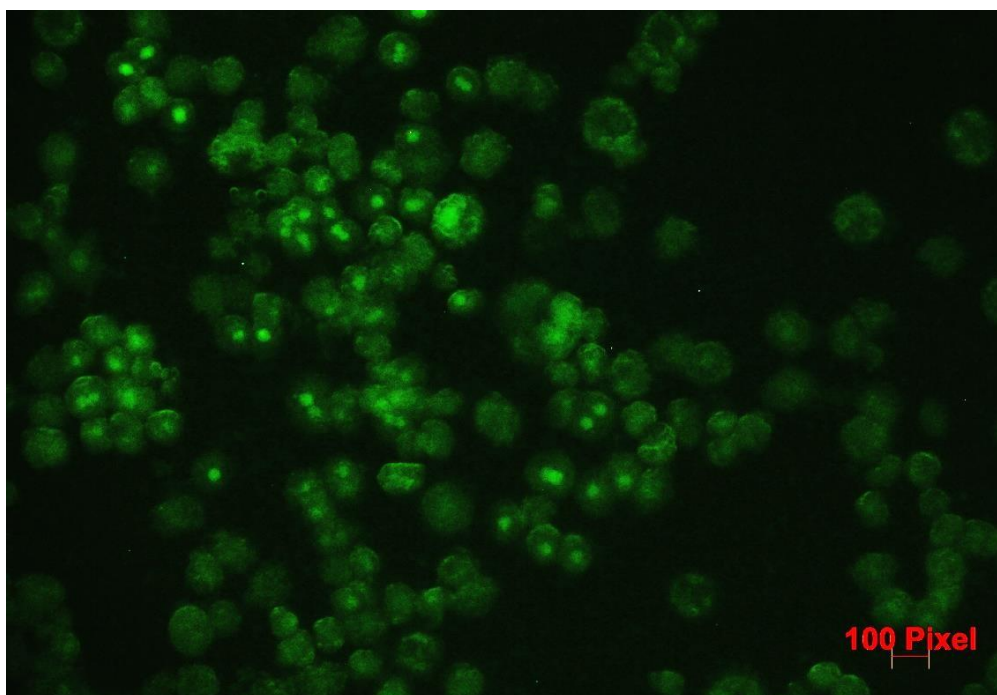


Рис. 1. Гепатоциты крыс инкубация 24 часа. Группа контроль. Окраска на каспазы 3/7. Ув.200X.

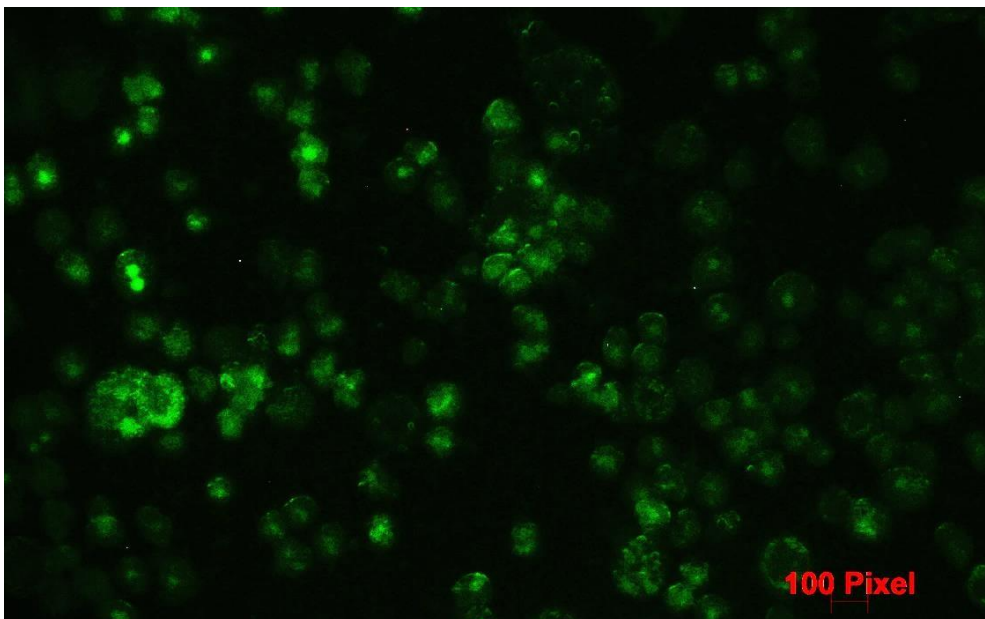


Рис. 2. Гепатоциты крыс инкубация 24 часа. Группа Хитозан 10 мкг/мл. Окраска на каспазы 3/7. Ув.200Х.

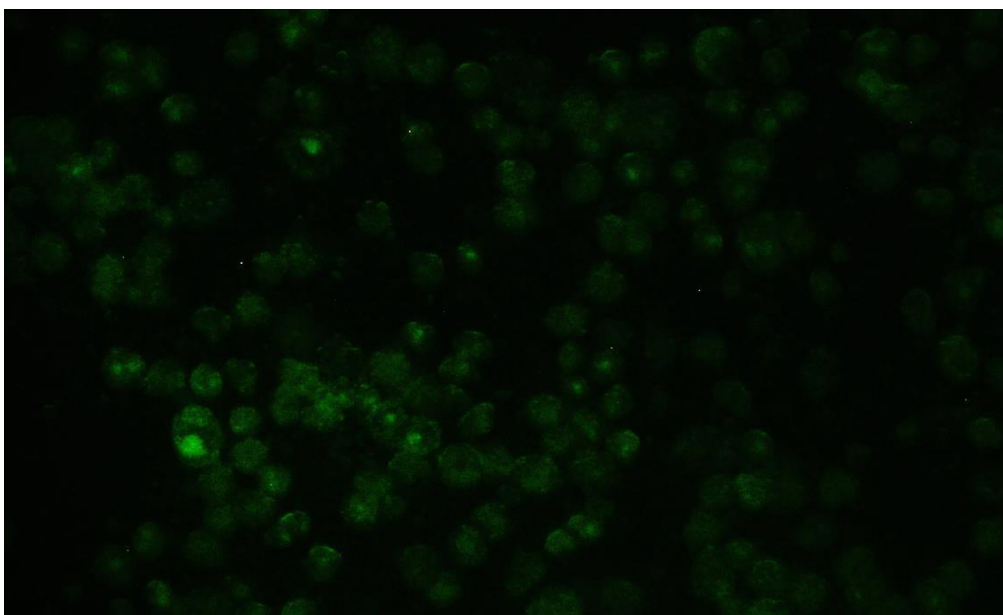


Рис. 3. Гепатоциты крыс инкубация 24 часа. Группа Хитозан 50 мкг/мл. Окраска на каспазы 3/7. Ув.200Х.

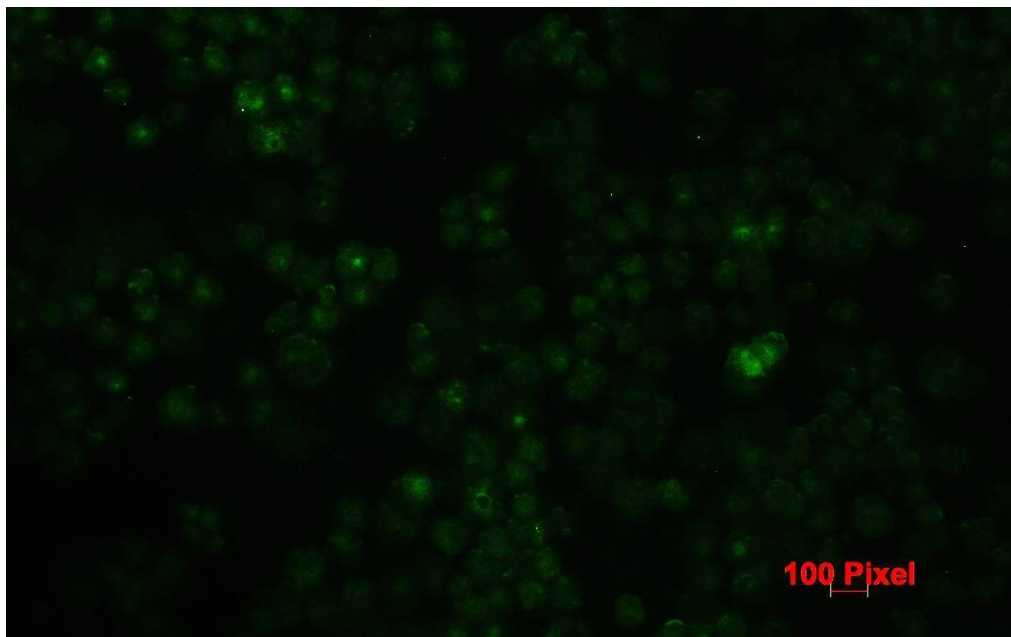


Рис. 4. Гепатоциты крыс инкубация 24 часа. Группа Хитозан 100 мкг/мл. Окраска на каспазы 3/7. Ув.200X.

Показано, что при добавлении Хитозана 10 мкг/мл количество клеток в апоптозе снижается на 5% по сравнению с контрольной группой (Рис. 5.). Хитозан в концентрации 50мкг/мл снижал количество клеток в апоптозе на 31% по сравнению с контрольной группой. Хитозан в концентрации 50мкг/мл снижал количество клеток в апоптозе на 36% по сравнению с контрольной группой.

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
«ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

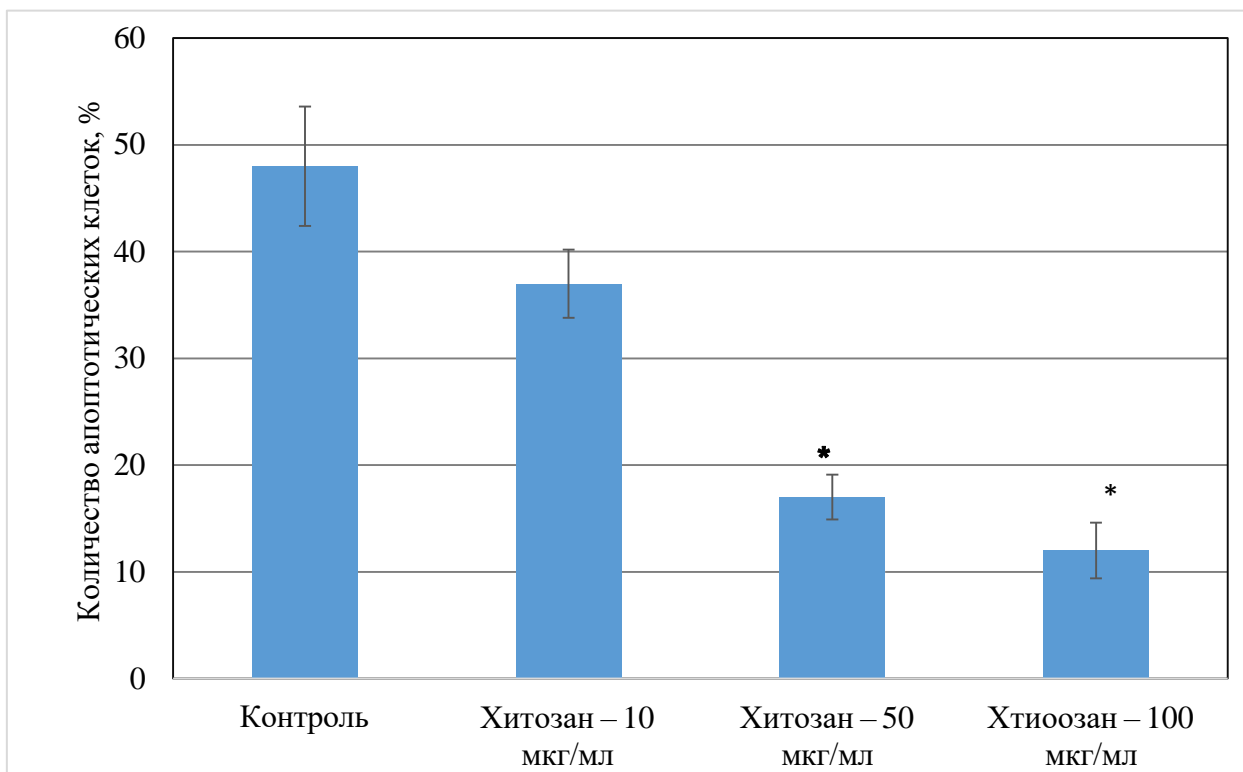


Рис. 5. Изменение количества апоптотических клеток гепатоцитов крысы при моделировании окислительного стресса. ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* -  $p < 0.01$  по отношению к группе Контроль

Таким образом, анализ данных показал, что Хитозан (гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана) оказывает выраженное гепатопротекторное действие, которое заключается в уменьшении количества апоптотических клеток при моделировании окислительного стресса. Полученные результаты позволяют рассматривать гидратированные комплексы низкомолекулярного хитозана в качестве перспективного гепатопротектора, что может иметь важное практическое значение в онкологии при полихимиотерапии цитостатиками, которые наряду с миелосупрессией обладают выраженным гепатотоксическим действием.