

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА В СОСТАВЕ ИСКУССТВЕННОЙ ВИРУСОПОДОБНОЙ ЧАСТИЦЫ

Г.М. Сысоева¹, Е.И. Рябчикова², О.В. Симакова¹, Е.А. Волосникова¹, Л.Р. Лебедев¹, Е.Д. Даниленко¹

¹Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; Россия, 633010 Бердск, ул. Химзаводская, 9;

²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Акад. Лаврентьева, 8

Контакты: Галина Михайловна Сысоева sysoeva_gm@vector.nsc.ru

Введение. Фактор некроза опухоли α (ФНО- α) — природный цитокин, обладающий выраженными противоопухолевыми свойствами. Широкий спектр побочных эффектов служит препятствием для применения ФНО- α в клинической практике. Одним из способов улучшения его терапевтических свойств является повышение тропности белка к ткани опухоли за счет включения в средства адресной доставки.

Цель исследования — изучение противоопухолевого действия препарата ФНО- α в составе искусственной вирусоподобной частицы (ВПЧ-ФНО- α), разработанной в ГНЦ ВБ «Вектор» для транспортировки белков к клеткам-мишеням.

Материалы и методы. Противоопухолевый эффект ВПЧ-ФНО- α исследовали на экспериментальной модели меланомы мышей B16F10 по изменению динамики роста опухоли (объем, масса) и ее морфологической структуры (наличие некротических процессов, деструкции сосудов). Содержание эффекторных клеток иммунной системы (CD3⁺, CD11b⁺) в ткани опухоли определяли иммуногистохимическим методом.

Результаты. ВПЧ-ФНО- α при внутривенном введении в дозах 5×10^4 и 1×10^5 МЕ/мышь замедлял рост первичной опухоли. Наиболее выраженный и стабильный эффект был отмечен при 5-кратном введении препарата в дозе 1×10^5 МЕ с интервалом 1 день: торможение роста опухоли составляло 40 и 47 % через 1 и 7 сут после окончания введения соответственно. Инъекции препарата вызывали увеличение степени деструкции опухолевой ткани и нарастание некротических изменений, повреждение и разрушение кровеносных сосудов опухоли, ее инфильтрацию иммунокомпетентными клетками.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о противоопухолевой активности препарата ФНО- α в средстве доставки, что позволяет предполагать возможность его применения в дальнейшем для лечения злокачественных новообразований, в частности меланомы.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли α , вирусоподобная частица, меланома, торможение роста опухоли

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-96-103



EVALUATION OF ANTITUMOR ACTIVITY OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA WITHIN THE ARTIFICIAL VIRUS-LIKE PARTICLE

G.M. Sysoeva¹, E.I. Ryabchikova², O.V. Simakova¹, E.A. Volosnikova¹, L.R. Lebedev¹, E.D. Danilenko¹

¹Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology Vector of the Rosпотребнадзор; 9 Khimzavodskaya St., Berdsk 633010, Russia;

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Lavrentjev Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

Introduction. Tumor necrosis factor α (TNF- α) is a natural cytokine, characterized by pronounced antitumor properties. A wide range of side effects serves as an obstacle for the use of TNF- α in clinical practice. One of the ways to improve its therapeutic properties is to increase the tropism of the cytokine to the tumor tissue by incorporating it into the targeted delivery system.

The aim of the study was to evaluate the antitumor activity of the preparation containing TNF- α as part of the artificial “virus-like particle” (VLP-TNF- α), developed in SRC VB “Vector” as a transport system for delivering proteins to target cells.

Materials and methods. The antitumor effect of VLP-TNF- α preparation was evaluated in experimental B16F10 melanoma model by the change of dynamics of tumor growth (volume, mass) and its morphological structure (presence of necrotic processes, blood vessel destruction). The number of the effector immune cells (CD3⁺, CD11b⁺) in the tumor tissue was determined by immunohistochemical method.

Results. It has been shown that VLP-TNF- α administered intravenously at the doses of 5×10^4 and 1×10^5 IU/mouse inhibits the growth of the primary tumor. The most pronounced and stable effect was observed with a five-fold administration at the dose of 1×10^5 IU/mouse every other day: tumor growth inhibition was 40 % on the 1st day, and 47 % on the 7th day upon the treatment. Injections of the preparation

resulted in the increase of necrosis number, destruction level of the tumor tissue, development of damage and destruction of the tumor blood vessels and its infiltration with immunocompetent cells.

Conclusion. The obtained data indicates that TNF- α within the delivery system exerts antitumor activity, which suggests the possibility of its further use for the treatment of malignant neoplasms, in particular, melanoma.

Key words: tumor necrosis factor α , virus-like particle, melanoma, tumor growth inhibition

Введение

Среди современных методов лечения онкологических заболеваний особое внимание в последние годы уделяется разработке и совершенствованию методов иммунотерапии, в частности цитокинотерапии [1]. Фактор некроза опухоли α (ФНО- α) — природный белок-цитокин, обладающий способностью тормозить рост и вызывать геморрагический некроз опухолей благодаря индукции апоптоза опухолевых клеток, повреждающему действию на сосуды опухоли, активации иммунных противоопухолевых реакций [2, 3]. Однако выраженные токсические эффекты ФНО- α при его системном введении служат серьезным препятствием для применения препарата в онкологической практике. В связи с этим предпринимаются многочисленные попытки улучшить терапевтические характеристики ФНО- α , среди которых особый интерес представляет разработка дизайна средств адресной доставки белка к клеткам-мишеням [4–6]. В опубликованных источниках есть сведения о создании препаратов ФНО- α в средствах доставки на основе наночастиц, полимеров, липосом [7–9]. Показано, что использование этих систем позволяет повысить накопление белка в ткани опухоли и, как следствие, его противоопухолевую активность. К их недостаткам можно отнести отсутствие в организме систем деградации компонентов транспортеров и возможность их кумуляции (средства доставки на основе неорганических частиц либо полученные с использованием синтетических полимеров), быструю элиминацию из организма клетками-фагоцитами (липосомы), нестабильность в биологических средах.

Сотрудниками ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана и запатентована оригинальная молекулярная конструкция, названная вирусоподобной частицей (ВПЧ), для транспортировки белков с целью их защиты от протеаз и увеличения накопления в ткани опухоли [10]. Конструкция представляет собой частицу, ядро которой состоит из двуспиральной РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, покрытой слоем конъюгата декстрана (полиглюкина) со спермидином, удерживаемого за счет ионного взаимодействия между отрицательно заряженным полинуклеотидным комплексом и положительно заряженным спермидином, а ФНО- α ковалентно связан с активированным полиглюкином. Было показано, что введение

ФНО- α в составе ВПЧ интактным мышам и мышам с трансплантированной карциномой Эрлиха приводило к удлинению периода его циркуляции в кровеносном русле и повышению противоопухолевой активности [11]. Препарат обладал тропностью к ткани опухоли и коже, что позволяет предполагать возможность его применения для лечения злокачественных новообразований, в частности меланомы [12].

Цель исследования — изучение противоопухолевого действия препарата ФНО- α в составе средства доставки на экспериментальной модели меланомы мышей B16F10.

Материалы и методы

В экспериментах использовали препарат рекомбинантного ФНО- α человека в составе искусственной ВПЧ (ВПЧ-ФНО- α), лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, полученный в соответствии с Патентом РФ № 2386447, с концентрацией белка 0,1 мг/мл и цитолитической активностью $1,55 \times 10^7$ МЕ/мг. Опухолевый штамм меланомы мышей B16F10 получен из коллекции опухолевых штаммов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва).

Для моделирования опухолевого процесса использовали мышей линии C57BL/6 обоего пола с массой тела 20–23 г, полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Животные содержались группами по 8–10 особей в пластиковых клетках в условиях естественного освещения на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище. Работа выполнена с соблюдением СП 2.2.1.3218–14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Протокол-заявка № ИМБТ/03–09.2016 на использование лабораторных животных утвержден Bio-этической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 4 от 12.09.2016).

Клетки меланомы B16F10 трансплантировали мышам внутримышечно в дозе 1×10^6 кл./мышь в объеме 0,1 мл. Внутримышечный способ перевивки

опухолевых клеток был выбран, исходя из особенностей противоопухолевого действия препарата ФНО- α . Поскольку одним из основных механизмов является деструктивное влияние ФНО- α на сосуды опухоли, максимальный эффект препарата следовало ожидать в отношении экспериментальных опухолей с развитой сосудистой системой, что в большей степени обеспечивается внутримышечной перевивкой опухоли по сравнению с классическим подкожным введением [1, 13].

Препарат ВПЧ-ФНО- α вводили внутривенно в дозах 5×10^4 или 1×10^5 МЕ/мышь (3 и 6 мкг соответственно) в объеме 0,5 мл трех- либо пятикратно, через день, начиная инъекции с 11-х суток после перевивки опухоли. Контрольным мышам в те же сроки вводили внутривенно физиологический раствор. Основанием для выбора доз и сроков начала введения препаратов ФНО- α послужили данные исследований J.M. Farma и соавт., а также результаты собственных экспериментов по изучению противоопухолевой активности препаратов ФНО- α и ВПЧ-ФНО- α [8, 10, 11, 13, 14].

На 11, 14, 16, 18 и 21-е сутки после перевивки опухоли проводили замер линейных размеров опухоли, рассчитывали объем опухолевого узла и процент торможения роста опухоли (ТРО). Объем опухоли вычисляли по формуле:

$$V (\text{мм}^3) = a \times b^2 / 2,$$

где a , b — длина, ширина опухоли соответственно (мм).

Для расчета процента ТРО использовали формулу:

$$\text{ТРО} (\%) = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

где V_k — средний показатель объема опухоли в контрольной группе; V_o — средний показатель опытной группы.

Эвтаназию животных методом мгновенной дислокации шейных позвонков и взятие образцов опухоли для гистологического исследования проводили через 1 сут после окончания курса инъекций.

Гистологические препараты опухолей после 24-часовой фиксации в 4 % растворе параформальдегида готовили по общепринятой методике; срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и по методу пикро-Маллори. Для проведения иммуногистохимического анализа парафиновые срезы монтировали на стекла, покрытые полилизин (Thermo Scientific, США). Для выявления маркеров CD11b и CD3 использовали кроличьи моноклональные антитела (Abscam, Великобритания). Срезы докрашивали гематоксилином Эрлиха и заключали в глицерин-желатин. Полученные препараты исследовали с помощью светового микроскопа Leica DM

2500 (Германия), фотосъемку осуществляли с помощью цифровой камеры Leica DFC420 C.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statgraphics PLUS Version 5.0 (Statistical Graphics Corporation, USA) либо Statistica 8. Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики: среднюю арифметическую и ошибку средней. Нормальность распределения признаков (показателей) оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки значимости межгрупповых различий нормально распределенных признаков применяли t -критерий Стьюдента, в противном случае использовали U -критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния препарата ВПЧ-ФНО- α на рост первичной опухоли

На рис. 1 представлена динамика изменения размеров экспериментальных опухолей на фоне введения препарата ВПЧ-ФНО- α в течение 16 сут после перевивки опухоли. Как видно из приведенных данных, 3-кратное внутривенное введение препарата в дозах 5×10^4 и 1×10^5 МЕ оказывало достоверное ингибирующее действие на рост меланомы B16F10. Максимально выраженный эффект наблюдался через 1 сут после 3-й инъекции препарата: ТРО в группе мышей, которым препарат вводили в дозе 5×10^4 МЕ, составляло 57 %, в дозе 1×10^5 МЕ — 64 %. Объем

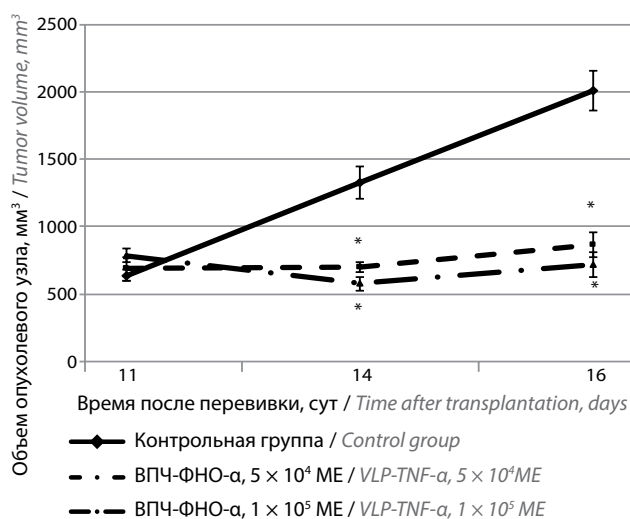


Рис. 1. Влияние 3-кратного введения препарата фактора некроза опухоли α в составе искусственной вирусоподобной частицы (ВПЧ-ФНО- α) в дозах 5×10^4 или 1×10^5 МЕ/мышь на скорость роста меланомы B16F10 у мышей C57Bl/6; *различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателем контроля

Fig. 1. Effect of threefold administration of tumor necrosis factor α within artificial virus-like particle (VLP-TNF- α) at the doses of 5×10^4 or 1×10^5 IU/mouse on the growth rate of B16F10 melanoma in C57Bl/6 mice; *significant difference from control, $p \leq 0.05$

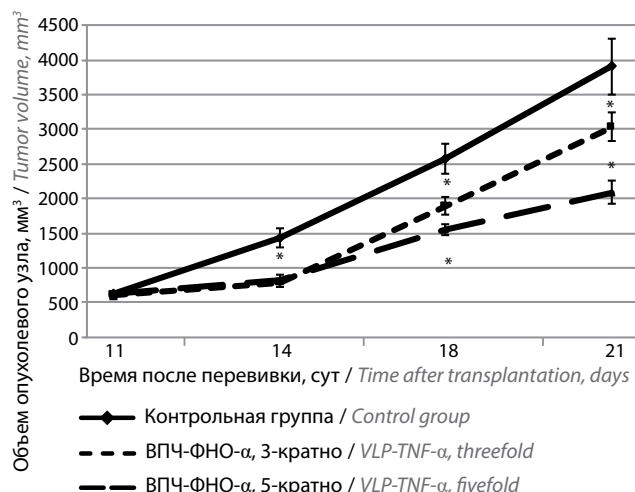


Рис. 2. Влияние внутривенного введения препарата фактора некроза опухоли α в составе искусственной вирусоподобной частицы (ВПЧ-ФНО- α) в дозе 1×10^5 МЕ/мышь, трех- или пятикратно, на скорость роста меланомы B16F10; *различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателем контроля

Fig. 2. Effect of threefold and fivefold administration of tumor necrosis factor α within artificial virus-like particle (VLP-TNF- α) at the dose of 1×10^5 IU/mouse on the growth rate of B16F10 melanoma; * significant difference from control, $p \leq 0.05$

опухоли в этот срок был равен 866 ± 90 и 716 ± 90 мм³ соответственно при контрольном уровне показателя 2011 ± 150 мм³.

Однако дальнейшее наблюдение показало ускорение роста опухоли в опытных группах по окончании курса введения препарата. Так, в группе мышей, которым препарат вводили в дозе 1×10^5 МЕ, через 7 сут после окончания введения объем опухоли достигал 3038 ± 208 мм³ при контрольном уровне показателя 3910 ± 406 мм³ (ТРО 22 %). Аналогичная тенденция наблюдалась в группе мышей, которым препарат вводили в дозе 5×10^4 МЕ. То есть использование этой схемы лечения не обеспечивало длительного ингибирования роста опухоли.

Более продолжительный эффект наблюдали в случае курсового 5-кратного, с интервалом в 1 день, введения препарата в дозе 1×10^5 МЕ (рис. 2). Эффект ингибирования был отмечен после 2-й инъекции препарата и сохранялся в течение всего периода наблюдения. Средний объем опухоли у мышей этой группы на 21-е сутки после перевивки (2-е сутки после окончания введения) составлял 2090 ± 171 мм³, на 25-е сутки — 3981 ± 410 мм³, что ниже соответствующих контрольных показателей в 1,9 и 1,5 раза (3910 ± 406 мм³ на 21-е сутки, 6062 ± 2425 мм³ на 25-е сутки). В группе мышей, которым препарат вводили в дозе 1×10^5 МЕ/мышь 5-кратно, было отмечено увеличение средней продолжительности жизни животных до $30,8 \pm 0,6$ дня, что на 21 % больше, чем в контрольной группе ($24,3 \pm 0,6$ дня) (различия достоверны, $p \leq 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат ВПЧ-ФНО- α обладает способностью тормозить рост экспериментальной опухоли меланомы B16F10 и увеличивать продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Наиболее выраженный и стабильный противоопухолевый эффект был отмечен при 5-кратном внутривенном введении препарата в дозе 1×10^5 МЕ/мышь с интервалом в 1 день.

Исследование влияния фактора некроза опухоли α в составе искусственной вирусоподобной частицы на морфологию экспериментальной опухоли

Как известно, противоопухолевый эффект ФНО- α реализуется, помимо цитотоксического воздействия на клетки опухоли, посредством 2 основных механизмов: через повреждение кровеносных сосудов опухоли и индукцию противоопухолевого иммунного ответа [15, 16]. В связи с этим для уточнения механизмов действия ФНО- α в средстве доставки было проведено исследование морфологии первичной опухоли, состояния кровеносных сосудов и присутствия эффекторных клеток иммунной системы в ткани опухоли после внутривенного введения препарата в сравнении с показателями контрольных животных.

На гистологических срезах опухолевых узлов меланомы B16F10, трансплантированной мышам C57Bl/6 контрольной группы, наблюдали участки некроза и зоны деструктивных изменений клеток, занимающих около 50 % площади среза через 1 сут после последнего введения физиологического раствора (16-е сутки после перевивки) и 45 % — через 7 сут после окончания инъекций (21-е сутки после перевивки). Деструктивные изменения меланомы сопровождалась отеком ткани. Визуально неизмененные опухолевые клетки были плотно расположены, их границы плохо различались. Эти клетки занимали около 30–40 % (у 3 из 5 мышей) и 50–70 % (у 2 из 5 мышей) площади среза опухолевого узла. В участках некроза и зонах деструкции целостность кровеносных сосудов была нарушена, наблюдались выход эритроцитов в поврежденную ткань опухоли и разрушение некоторых сосудов.

Площадь участков некроза и зон деструкции (43 %) на гистологических срезах меланомы B16F10 через 1 сут после последнего введения ВПЧ-ФНО- α в дозе 5×10^4 МЕ достоверно не отличалась от параметров контрольной группы. Однако отек ткани в зонах деструкции был более выраженным.

На срезах опухолевых узлов, взятых через 1 сут после окончания инъекций ВПЧ-ФНО- α в дозе 1×10^5 МЕ/мышь, выявлено более обширное повреждение опухолевой ткани по сравнению с контрольной группой и группой мышей, получавших препарат в меньшей дозе. Участки некроза и зоны деструкции

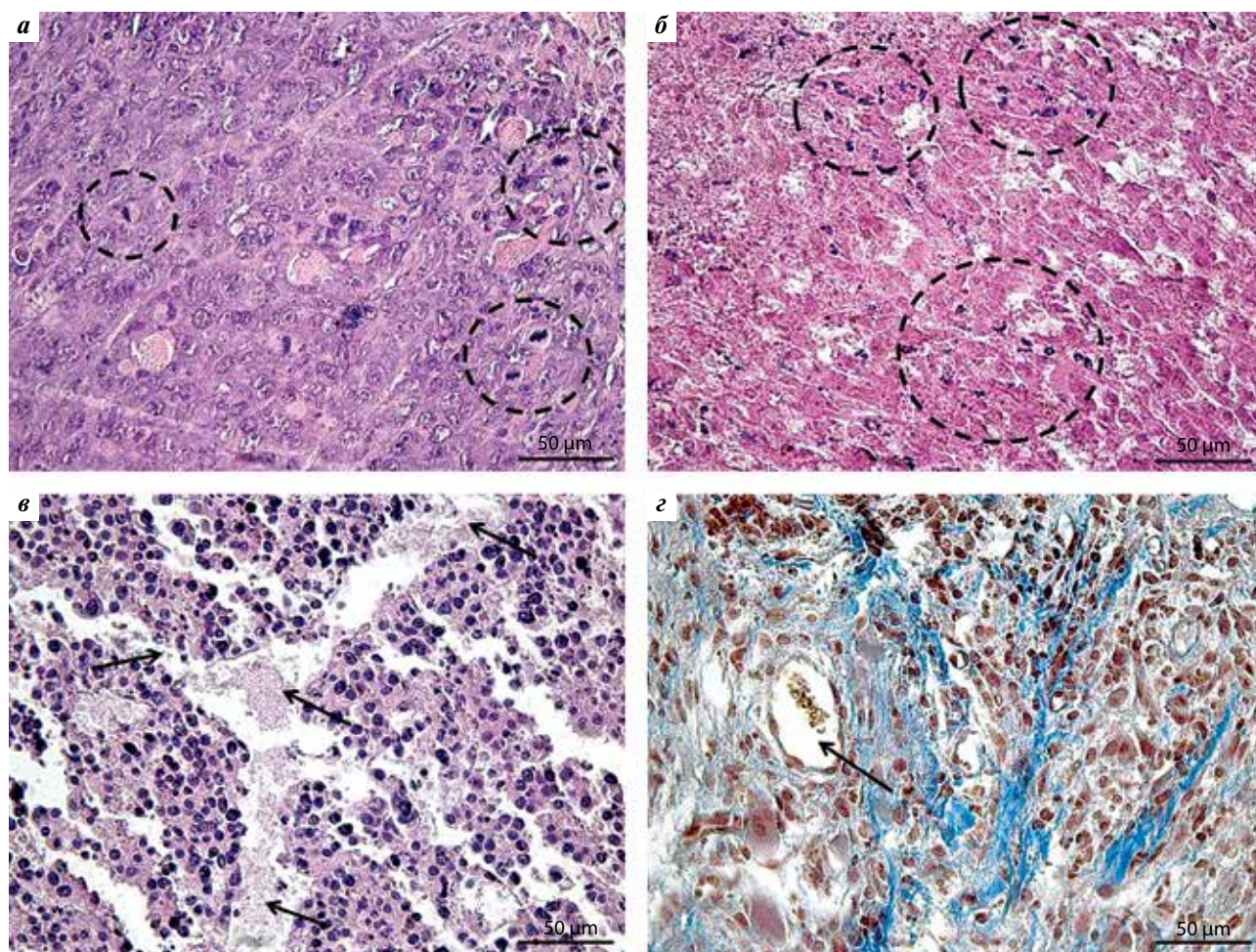


Рис. 3. Гистологические срезы меланомы B16F10, привитой мышам C57Bl/6, через 1 сут после последнего введения фактора некроза опухоли α в составе искусственной вирусоподобной частицы (1×10^5 МЕ/мышь): а — митозы в ткани опухоли (выделены пунктирной линией); б — внеклеточные структуры, сходные с хромосомами, окрашенные базофильно (выделены пунктирной линией); в — кровеносные сосуды с поврежденными стенками, агрегацией и лизисом эритроцитов (стрелки) в окружении поврежденных клеток опухоли (зона деструкции); г — коллагеновые волокна в опухоли (синего цвета), показан кровеносный сосуд с агрегировавшими эритроцитами (стрелка). Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином (а–в) и пикро-Маллори (г)

Fig. 3. Histological sections of B16F10 melanoma inoculated into C57Bl/6 mice, a day after the last administration of tumor necrosis factor α (1×10^5 IU/mouse): а — mitoses in the tumor tissue (marked with circles); б — extracellular structures similar to chromosomes, basophilic staining (marked with circles); в — blood vessels with damaged walls, aggregation and lysis of erythrocytes (arrows) surrounded by damaged tumor cells (destruction zone); г — collagen fibers in the tumor (blue), a blood vessel with aggregated erythrocytes (arrow). Light microscopy, hematoxylin-eosin (а–в) and picro-Mallory (г) staining

занимали около 80–90 % площади среза опухоли. В зонах деструкции опухолевых узлов наблюдались отек, клеточный детрит, измененные клетки меланомы, поврежденные сосуды. В то же время в ткани опухоли нередко встречались опухолевые клетки в состоянии митоза (рис. 3а). В зонах некроза и деструкции обнаружены структуры, по морфологии и размеру сходные с метафазными хромосомами опухолевых клеток, окрашенными базофильно (рис. 3б). По-видимому, введение препарата оказывает деструктивное действие на делящиеся клетки меланомы, в результате разрушения которых метафазные хромосомы оказываются в межклеточном пространстве. В ткани опухоли чаще, чем в других группах, наблю-

дались коллагеновые волокна (рис. 3г), указывающие на «оголение» соединительнотканной стромы вследствие разрушения опухолевых клеток. У 2 из 5 мышей отмечено замещение участка некроза соединительной тканью на ~5–7 % площади среза опухоли. Неизмененные опухолевые клетки занимали ~10–15 % площади среза. В опухолевых узлах отмечено повреждение ~70 % всех кровеносных сосудов, преимущественно в участках некроза и зонах деструкции опухолевой ткани (рис. 3з). У 1 из 5 мышей повреждены все кровеносные сосуды опухоли.

Таким образом, введение препарата ВПЧ-ФНО- α приводит к выраженным деструктивным изменениям клеток меланомы B16F10 и кровеносных сосудов,

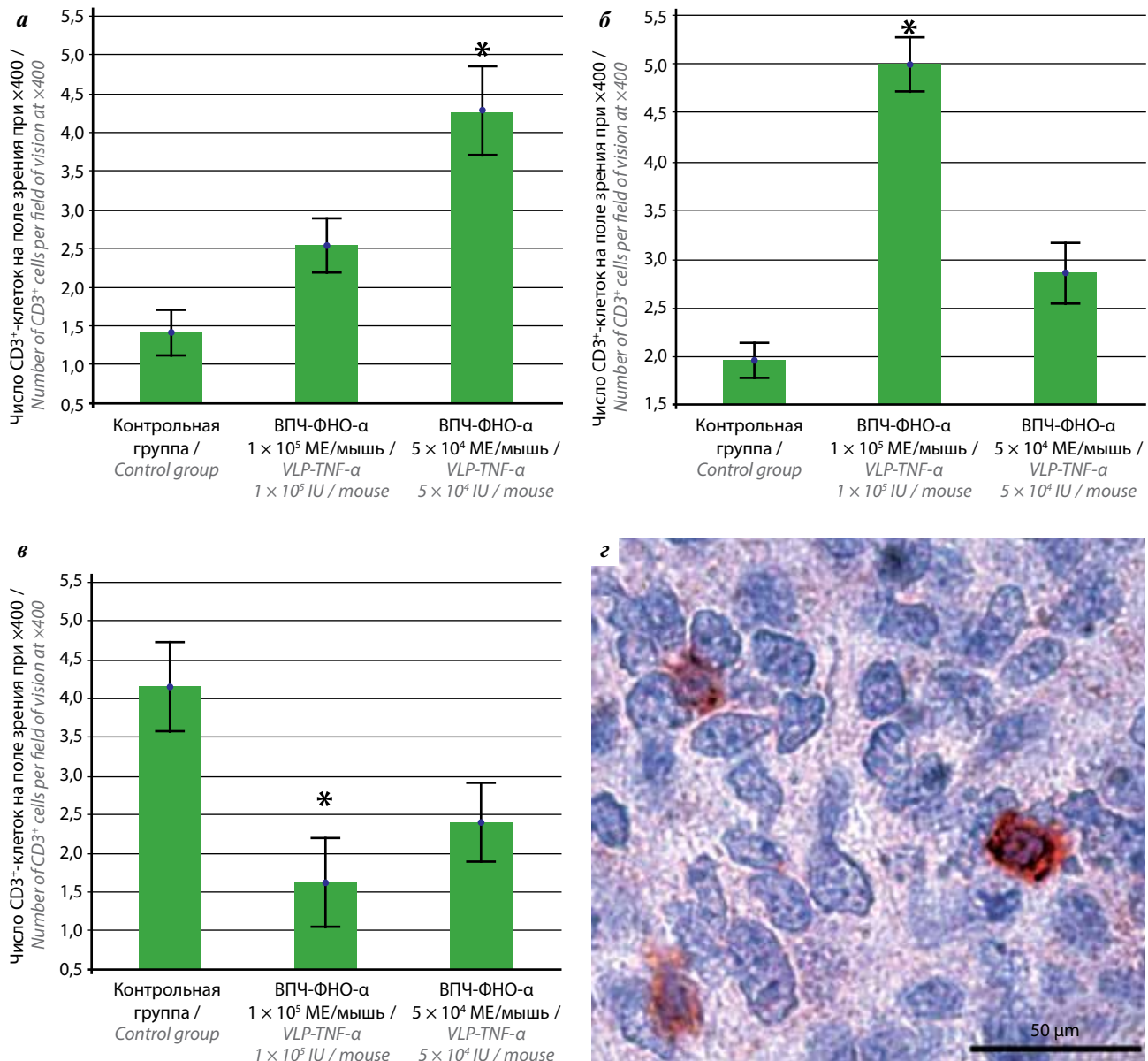


Рис. 4. Число CD3⁺-клеток в разных участках меланомы B16F10 у мышей: а – в визуально неповрежденной ткани; б – в разрушенной ткани опухоли; в – в соединительной ткани, окружающей опухоль; * – достоверные отличия; $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой; г – CD3⁺-клетки в ткани меланомы (окрашены в красный цвет), хромоген АЕС, докраска гематоксилином

Fig. 4. Number of CD3⁺-cells in different parts of B16F10 melanoma in mice: а) in the visually intact tissue; б – in the damaged tumor tissue; в – in the connective tissue surrounding the tumor; * – significant differences; $p \leq 0.05$, compared to the control group; г – CD3⁺-cells in melanoma tissue (stained red), AEC chromogen, additional staining with hematoxylin

степень которых несколько варьирует у разных животных, что может быть обусловлено их индивидуальными особенностями. Очевидно, наблюдаемое уменьшение размера опухоли обусловлено данными изменениями.

Чтобы проверить предположение об активации под действием ВПЧ-ФНО-α противоопухолевой иммунной реакции, был проведен иммуногистохимический анализ эффекторных клеток иммунной системы (Т-лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов), которые выявляли по наличию маркеров CD3 и CD11b.

На срезах узлов меланомы B16F10 мышей контрольной группы немногочисленные CD3⁺-клетки (Т-лимфоциты) встречались в соединительной ткани, прилежащей к опухоли, в визуально неповрежденной и разрушающейся ткани меланомы (рис. 4). В опытных группах мышей отмечено снижение числа CD3⁺-клеток в соединительной ткани и увеличение в опухоли. Количество CD3⁺-клеток при введении препарата в дозе 5×10^4 МЕ/мышь возрастало в неповрежденной опухолевой ткани, тогда как введение препарата в дозе 1×10^5 МЕ/мышь приводило к увеличению числа

меченых клеток в разрушенной или разрушающейся ткани опухоли. Это наблюдение указывает на влияние препарата на миграцию в опухоль эффекторных клеток иммунной системы, механизмы которого нуждаются в дополнительном исследовании.

Введение ВПЧ-ФНО- α в дозе 5×10^4 МЕ/мышь животным с трансплантированной меланомой B16F10 сопровождалось повышением в опухоли числа клеток, экспрессирующих рецептор адгезии CD11b (гранулоциты, моноциты). CD11b⁺-клетки локализовались поодиночке и в виде небольших скоплений исключительно в разрушенной и разрушающейся ткани меланомы, а их количество в 2,5 раза превышало контрольный уровень (110 ± 15 клеток в поле зрения при $\times 400$, в контрольной группе — 44 ± 6 , $p \leq 0,05$).

Как известно, инфильтрация опухолевых узлов лимфоцитами указывает на активацию противоопухолевых иммунных реакций, приводящих к деструкции опухолевой ткани [17, 18]. Способность цитокинов индуцировать миграцию (рекрутирование) лейкоцитов, особенно Т-клеток, в опухоль является одним из наиболее привлекательных свойств этих белков с точки зрения иммунотерапии рака [19, 20]. Можно предположить, что наблюдаемый рост числа CD3⁺- и CD11b⁺-лимфоцитов при введении ВПЧ-ФНО- α является одним из факторов, определяющих эффективность его противоопухолевого действия.

Таким образом, данные гистологического и иммуногистохимического исследования меланомы B16F10, привитой мышам C57Bl/6 и подвергнутой воздействию препарата ВПЧ-ФНО- α , подтверждают, что наиболее выраженным разрушительным влиянием на опухоль обладает препарат в дозе 1×10^5 МЕ/мышь. Деструктивное воздействие затрагивает как опухолевые клетки, так и кровеносные сосуды. Препарат способствует увеличению количества CD3⁺- и CD11b⁺-лимфоцитов в ткани меланомы, что подтверждает наличие у него иммуномодулирующего действия.

Заключение

Проведенное исследование показало, что внутривенное введение препарата ФНО- α в составе средства доставки ВПЧ оказывает противоопухолевый эффект на меланому B16F10, который выражается в замедлении роста и деструктивных изменениях первичного опухолевого узла. Наиболее выраженным и стабильным эффектом препарата был при его 5-кратном введении в дозе 1×10^5 МЕ/мышь. Деструкция опухолевой ткани под действием ВПЧ-ФНО- α сопровождалась разрушением кровеносных сосудов опухоли и повышением в опухолевой ткани содержания эффекторных клеток иммунной системы. Полученные данные позволяют предполагать возможность успешного применения препарата ВПЧ-ФНО- α в дальнейшем для лечения злокачественных новообразований, в частности меланомы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lee S., Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers* 2011;3(4): 3856–93. DOI: 10.3390/cancers3043856.
- Lejeune F.J., Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer* 2006;93(8):90–100.
- Roberts N.J., Zhou S., Diaz L.A.Jr., Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget* 2011;2(10):739–51. DOI: 10.18632/oncotarget.344.
- Dai Y.C., Yang S.M., Wang X. et al. Antitumor effect and mechanism of action of a tumor-targeting recombinant human tumor necrosis factor- α fusion protein mediated by urokinase. *Mol Med Rep* 2015;11(6):4333–40. DOI: 10.3892/mmr.2015.3313.
- Gong J., Tan G., Sheng N. et al. Targeted treatment of liver metastasis from gastric cancer using specific binding peptide. *Am J Transl Res* 2016;8(5):1945–56.
- Волосникова Е.А., Демин И.Ф., Левагина Г.М. и др. Синтез конъюгатов фактора некроза опухоли альфа с алендроновой кислотой. *Биоорганическая химия* 2016;42(6):704–11. [Volosnikova E.A., Demin I.F., Levagina G.M. et al. The synthesis of TNF- α conjugates with alendronic acid. *Bioorganicheskaya khimiya* = Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2016;42(6):704–11. (In Russ.)].
- Xu G., Gu H., Hu B. et al. PEG-b-(PELG-g-PLL) nanoparticles as TNF- α nanocarriers: potential cerebral ischemia/reperfusion injury therapeutic applications. *Int J Nanomedicine* 2017;12:2243–54. DOI: 10.2147/IJN.S130842.
- Farma J.M., Puhlmann M., Soriano P.A. et al. Direct evidence for rapid and selective induction of tumor neovascular permeability by tumor necrosis factor and a novel derivative, colloidal gold bound tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 2007;120(11):2474–80. DOI: 10.1002/ijc.22270.
- Messerschmidt S.K., Musyanovych A., Altwater M. et al. Targeted lipid-coated nanoparticles: delivery of tumor necrosis factor-functionalized particles to tumor cells. *J Control Release* 2009;137(1):69–77.
- Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. и др. Противоопухолевое средство на основе наночастиц, несущих рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека. Патент РФ № 2386447, опубли. 20.04.2010, заявка № 2008140246/15 от 13.10.2008. [Masycheva V.I., Lebedev L.R., Danilenko E.D. et al. Anticancer drug based on nanoparticles bearing recombinant human tumor necrosis factor alpha. Patent № 2386447 RU C1. N 2008140246/15. Priority from 13.10.2008; date of publ. 20.04.2010. (In Russ.)].
- Гамалей С.Г., Батенева А.В., Сысоева Г.М. и др. Фармакокинетика и противоопухолевые свойства препарата ФНО- α в составе наночастиц. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2010;149(3):320–3. Доступно по: <https://doi.org/10.1007/s10517-010-0937-9>. [Gamaley S.G., Bateneva A.V., Sysoeva G.M. et al. Pharmacokinetics and antitumor effects

- of the drug containing TNF- α in nanoparticles. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bull Exp Biol Med 2010;149(3):320–3. (In Russ.).
12. Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д., Батенева А.В. и др. Фармакокинетика молекулярной конструкции для депонирования и транспортировки к клеткам-мишеням биологически активных веществ. Сибирский медицинский журнал = The Siberian Medical Journal 2008;23(3):92–5. [Gamaley S.G., Danilenko E.D., Bateneva A.V. et al. Pharmacokinetics of molecular construction for deposition and transportation of biologically active substances to target cells. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal 2008;23(3):92–5. (In Russ.).]
 13. Tandle A., Hanna E., Lorang D. et al. Tumor vasculature-targeted delivery of tumor necrosis factor- α . Cancer 2009;115(1):128–39. DOI: 10.1002/cncr.24001.
 14. Jiang J., Bischof J. Effect of timing, dose and interstitial versus nanoparticle delivery of tumor necrosis factor α in combinatorial adjuvant cryosurgery treatment of ELT-3 uterine fibroid tumor. Cryo Letters 2010;31(1):50–62.
 15. Manzo T., Sturmheit T., Basso V. et al. T-cells redirected to a minor histocompatibility antigen instruct intratumoral TNF α expression and empower adoptive cell therapy for solid tumors. Cancer Res 2017;77(3):658–71. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0725.
 16. Porcellini S., Asperti C., Valentinis B. et al. The tumor vessel targeting agent NGR-TNF controls the different stages of the tumorigenic process in transgenic mice by distinct mechanisms. Oncoimmunology 2015;4(10):1041700. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1041700.
 17. Tang H., Qiao J., Fu Y.X. Immunotherapy and tumor microenvironment. Cancer Lett 2016;370(1):85–90. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.009.
 18. Tähtinen S., Kaikkonen S., Merisalo-Soikkeli M. et al. Favorable alteration of tumor microenvironment by immunomodulatory. Cytokines for efficient T-cell therapy in solid tumors. PLoS One 2015;10(6):0131242. DOI: 10.1371/journal.pone.0131242.
 19. Fisher T.S., Hooper A.T., Lucas J. et al. A CD3-bispecific molecule targeting P-cadherin demonstrates T cell-mediated regression of established solid tumors in mice. Cancer Immunol Immunother 2018;67(2):247–59. DOI: 10.1007/s00262-017-2081-0.
 20. Gooden M.J., de Bock G.H., Leffers N. et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. Br J Cancer 2011;105(1):93–103. DOI: 10.1038/bjc.2011.189.

Вклад авторов

Г.М. Сысоева: разработка дизайна исследования, получение и анализ экспериментальных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

Е.И. Рябчикова: получение и анализ данных, редактирование текста статьи;

О.В. Симакова: получение и анализ экспериментальных данных;

Е.А. Волосникова: характеристика экспериментальных образцов препарата ВПЧ-ФНО- α ;

Л.Р. Лебедев: получение экспериментальных образцов препарата ВПЧ-ФНО- α ;

Е.Д. Даниленко: разработка дизайна исследования, анализ экспериментальных данных, редактирование текста статьи.

Author's contributions

G.M. Sysoeva: developing the research design, obtaining and analysis of experimental data, reviewing publications on the topic, article writing;

E.I. Ryabchikova: obtaining and analysis of data, editing article text;

O.V. Simakova: obtaining and analysis of experimental data;

E.A. Volosnikova: characterization of experimental samples of the drug VLP-TNF- α ;

L.R. Lebedev: obtaining experimental samples of the drug VLP-TNF- α ;

E.D. Danilenko: analysis of experimental data, editing article text.

ORCID авторов/ORCID of authors

Г.М. Сысоева/G.M. Sysoeva: <https://orcid.org/0000-0001-7064-4117>

Е.И. Рябчикова/E.I. Ryabchikova: <https://orcid.org/0000-0003-4714-1524>

О.В. Симакова/O.V. Simakova: <https://orcid.org/0000-0002-1222-7574>

Е.А. Волосникова/E.A. Volosnikova: <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Л.Р. Лебедев / L.R. Lebedev: <https://orcid.org/0000-0001-9886-4939>

Е.Д. Даниленко / E.D. Danilenko: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», Государственный контракт № 14.N08.12.0089 от 29.08.2016 г.

Financing. The work was carried out with the financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation in the framework of the Federal target program “Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond”, State contract No. 14.N08. 12. 0089 from 29.08.2016.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 12.07.2019. **Принята к публикации:** 19.12.2019.

Article submitted: 12.07.2019. **Accepted for publication:** 19.12.2019.