



## **Противоопухолевая активность наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот в отношении экспериментальной аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6**

**В.Ю. Балабаньян<sup>1</sup>, В. Боят<sup>1</sup>, Г.Д. Капанадзе<sup>2</sup>, Я.М. Хамди<sup>3</sup>, В.И. Швеиц<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> – Общество с ограниченной ответственностью «Технология лекарств», Московская область

<sup>2</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>3</sup> – Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва

Контактная информация: Балабаньян Вадим Юрьевич [bal.pharm@mail.ru](mailto:bal.pharm@mail.ru)

---

В экспериментах *in vivo* выявлена способность наносомальной формы паклитаксела оказывать выраженный цитостатический эффект в отношении аденокарциномы молочной железы Ca755 у мышей линии C57BL6, экспрессирующей Р-гликопротеин.

**Ключевые слова:** наночастицы, паклитаксел, аденокарцинома молочной железы, Р-гликопротеин.

---

Паклитаксел – химиотерапевтическое средство из группы таксанов, ингибитор образования микротрубочек с антиангиогенным и апоптотическим действием [12, 13]. Паклитаксел оказывает выраженный цитостатический эффект в исследованиях *in vitro*, при этом его клиническое применение лимитировано следующими показаниями: немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак молочной железы и саркома Капоши у больных СПИД-ом [6]. Снижение ак-

тивности паклитаксела *in vivo* в определенной степени обусловлено множественной лекарственной устойчивостью опухолевых клеток [8,9]. Паклитаксел является субстратом Р-гликопротеина, что существенно снижает его эффективность при лечении высокорезистентных опухолей, продуцирующих Р-гликопротеин [10].

Одним из способов преодоления лекарственной резистентности опухолевых клеток является создание нанораз-

мерных форм цитостатиков на основе полимерных наночастиц [11]. Учитывая вышеизложенное, нами была разработана технология получения наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) с поверхностью частиц, модифицированной полоксамером 188 (Плюроник Ф 68). Предложенная технология позволяет получать стабильную наносуспензию с размером частиц  $250 \pm 50$  нм при степени включения паклитаксела 90-95 % [2]. Проведенные нами исследования *in vitro* выявили способность разработанной наносомальной формы паклитаксела оказывать выраженный цитостатический эффект *in vitro* в отношении высокорезистентных клеток Т-лимфобластного лейкоза (Jurkat WT), экспрессирующих Р-гликопротеин [1,3,7].

**Целью** данного исследования явилось изучение противоопухолевой активности наносомальной формы паклитаксела на модели *in vivo* – резистентной аденокарциноме молочной железы Ca 755 у мышей линии C57BL6.

### **Материалы и методы**

Исследование выполнено на перевиваемой модели опухолевого роста мышей – солидной опухоли - аденокарциноме молочной железы, штамм Ca755, экспрессирующий Р-гликопротеин. Штамм Ca755 получен из коллекции опухолей Научно-исследовательского института морфологии человека РАМН.

Аденокарцинома Ca755 впервые получена в 1936 г. от спонтанной опухоли молочной железы у самки мыши C57BL6. Штамм был создан в Национальном институте рака США 5 сентя-

бря 1973 г. Средняя продолжительность жизни животных с опухолью – 23-27 дней. Поддерживается на мышах линии C57BL6. В опытах использовали 2-ой пассаж перевиваемой модели. Опухоли перевивали по стандартной методике половозрелым мышам-самкам линии C57BL6 массой 18-22 г (в каждой группе по 16 животных). Инокуляция опухолевых клеток проводилась подкожно в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1:10 ( $5 \times 10^6$  клеток). Введение наносомальной и стандартной форм паклитаксела проводилось один раз в сутки в хвостовую вену в течение 7 дней; первое введение препаратов осуществляли через 48 часов после прививки опухолевых клеток. Наблюдение за мышами проводилось в течение 50 дней после введения опухолевых клеток животным. Исследуемые лекарственные формы тестировали в 3-х дозах: 19 мг/кг, 9,5 мг/кг и 6,4 мг/кг (в расчете на паклитаксел).

Оценку эффективности лечения проводили по показателям увеличения продолжительности жизни и торможения роста опухоли [4].

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) леченных животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле 1:

$$\text{УПЖ \%} = (\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_к) / \text{СПЖ}_к \times 100 \quad (1),$$

где СПЖ<sub>0</sub> и СПЖ<sub>к</sub> – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных. Показатели эффективности изучаемых препаратов определяли в сравнении с контрольными группами.

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле 2:

$$\text{ТРО \%} = (V_k - V_0) / V_k \times 100 \quad (2),$$

где  $V_k$  и  $V_0$  – средний объем опухолей ( $\text{мм}^3$ ) в контрольной и опытной группах, который для каждой солидной опухоли определялся как произведение размеров трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили на 1, 6, 8 и 14-е сутки после прекращения лечения.

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Статистика 6.0 (StatSoft, USA). Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими методами, так как тип распределения был нормальным. В качестве параметрического критерия использовали t-критерий Стьюдента для независимых переменных. Различия были определены при 0.05 уровне значимости. Результаты исследования выражали как среднее  $\pm$  ошибка среднего.

## Результаты и их обсуждение

Результаты определения продолжительности жизни на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 у мышей линии C57BL6 представлены в таблице 1. При вычислении средней продолжительности жизни мышей в каждой группе не учитывали животных, павших в период лечения. Это позволило отделить противоопухолевое действие тестируемых лекарственных форм от токсического эффекта.

Увеличение продолжительности жизни на 25% и более считается показателем терапевтической эффективности тестируемого вещества [4]. На основании этого можно заключить, что наносомальная форма паклитаксела оказала выраженный цитостатический эффект в отношении аденокарциномы молочной железы во всех трех тестируемых дозах, тогда как стандартная форма подобным эффектом не обладала. При введении тестируемых форм мышам в

Таблица 1

### Влияние наносомальной и стандартной форм паклитаксела на продолжительность жизни мышей линии C57BL6

Препарат	Доза активного вещества, мг/кг	Средняя продолжительность жизни (дни, $M \pm m$ )	Увеличение продолжительности жизни (%)
Контроль (физиологический раствор)	0	23,9 $\pm$ 0,98	-
Паклитаксел (стандартная форма)	19	25,3 $\pm$ 0,53	5,8
	9,5	27,5 $\pm$ 0,77*	15,0
	6,4	26,7 $\pm$ 0,68*	11,7
Паклитаксел (наносомальная форма)	19	30,9 $\pm$ 0,71*	29,2
	9,5	35,2 $\pm$ 0,91*	47,2
	6,4	31,5 $\pm$ 0,78*	31,2

Примечание: \* – статистически значимое отличие от контроля по t-критерию Стьюдента, при  $p < 0,05$ .

более высокой дозе (19 мг/кг) показатель УПЖ снижался, что объясняется токсичностью паклитаксела, в результате которой происходила частичная гибель животных на ранних сроках исследования. При этом наносомальная форма существенно снижала токсичность паклитаксела.

Результаты влияния тестируемых форм паклитаксела на рост опухоли представлены в табл. 2.

Активными в противоопухолевом отношении считаются дозы препаратов, вызывающие торможение роста опухоли  $\geq 70\%$  продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [4]. Анализируя терапевтическое действие тестируемых форм паклитаксела, мож-

но отметить, что по показателю ТРО наносомальная форма проявила эффективность во всех трех экспериментальных дозах. При этом эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения, что обусловлено постепенной биодеградацией наночастиц и выходом из них паклитаксела. Стандартная форма паклитаксела статистически достоверно тормозила рост опухоли, однако показатель ТРО находился в диапазоне от 46 до 19 %, тогда как для наносомальной формы этот показатель составил от 81 до 70 %.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что наносомальная форма паклитаксела оказывает выраженный цитостатический эффект в

Таблица 2  
Влияние наносомальной и стандартной форм паклитаксела на рост аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6

Препарат	Доза активного вещества, мг/кг	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> , M±m), (ТРО)			
		Дни после окончания лечения			
		1	6	8	14
Контроль (физиологический раствор)	0	2896±356	6228±708	9490±899	28218±3140
Паклитаксел (стандартная форма)	19	1613±84* (44%)	3949±263* (37%)	6458±310* (32%)	21249±834* (25%)
	9,5	1724±133* (40%)	3718±309* (40%)	5124±615* (46%)	20522±1019* (27%)
	6,4	1942±141* (33%)	4284±434* (31%)	6910±645* (27%)	22880±1376* (19%)
Паклитаксел (наносомальная форма)	19	547±97* (81%)	1743±279* (72%)	2457±583* (74%)	7108±831* (75%)
	9,5	733±130* (75%)	1872±383* (70%)	2681±565* (72%)	8186±864* (71%)
	6,4	810±121* (72%)	1784±471* (71%)	2596±588* (73%)	7925±1225* (72%)

Примечание: \* – статистически значимое отличие от контроля по t-критерию Стьюдента, при  $p < 0,05$ .

отношении резистентной аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6. В свою очередь, выявленный эффект является результатом проникновения паклитаксела в клетки аденокарциномы, экспрессирующие Р-гликопротеин. Существенную роль в этом процессе играет плуроник Ф 68, применяемый для модификации поверхности наночастиц. Известно, что плуроник Ф 68 индуцирует конформационные изменения, приводящие к снижению сродства Р-гликопротеина для лекарственных веществ и АТФ, а также вызывает внутриклеточное снижение АТФ, необходимое для функционирования системы Р-гликопротеина [5,14]. Полученные нами результаты коррелируют с данными Vauthier С. и соавт. о способности полибутилдианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом 80, обеспечивать транспорт доксорубина в резистентные опухолевые клетки [15].

### Список литературы

1. **Боят В., Балабаньян В.Ю., Аляутдин Р.Н.** Внутриклеточное накопление и противоопухолевая активность наносомальных форм паклитаксела // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011. Т.74, №3. С. 22-25.
2. **Боят.В., Хамди Я.М, Балабаньян В.Ю. и др.** Получение наносомальной лекарственной формы паклитаксела // Фармация. 2010. №4. С. 32-33.
3. **Боят В., Хамди Я.М., Балабаньян В.Ю. и др.** Цитотоксический эффект паклитаксела, включенного в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т.151. №3. С. 315-318.
4. **Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1.** М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
5. **Anand P., Nair H.B., Sung B., et al.,** Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochem Pharmacol* 79(3) (2010) 330-338.
6. **Bardelmeijer H.A., Beijnen J.H., Brouwer K.R., et al.,** Increased oral bioavailability of paclitaxel by GF120918 in mice through selective modulation of P-glycoprotein, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 4416-4421.
7. **Bojat V., Balabanyan V.Yu., Alyautdin R.N.** The entrapment of paclitaxel in PLGA nanoparticles increases its cytotoxicity against multiresistant cell line // *British Journal of Medicine and Medical Research.* -2011.- №1(4).- P. 306-319.
8. **Cornaire G., Woodley J., Hermann P., et.al.,** Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo, *Int J Pharm.* 2004 Jun 18;278(1):119-31.
9. **Gallo J.M., S. Li, P. Guo, K. Reed, et. al.,** The effect of P-glycoprotein on paclitaxel brain and brain tumor distribution in mice. *Cancer Res* 63(16) (2003) 5114-5117.
10. **Ganta S., Amiji M.,** Coadministration of Paclitaxel and Curcumin in Nanoemulsion Formulations To Overcome Multidrug Resistance in Tumor Cells. *Mol. Pharmaceutics* 6 (3) (2009) 928-939.
11. **Musyanovych A., Schmitz-Wienke J., Mailander V., et. al.,** Preparation of

- biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. *Macromol Biosci* 8(2) (2008) 127-139.
12. **Grogan BT, Gilmartin B, Carney DN,** Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1785:96-132.
13. [http://www.vidal.ru/poisk\\_preparatov/act\\_793.htm](http://www.vidal.ru/poisk_preparatov/act_793.htm)
14. **Thomas H., Coley H.M.,** Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control*. 2003;10:159-165.
15. **Vauthier C., Dubernet C., Chauvierre C., et.al.,** Drug delivery to resistant tumors the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles.// *J. Control. Release*. 2003. V.93. N 2. P. 151-160.

## **Antitumor activity of nanoparticulate paclitaxel formulation based on lactic and glycolic acids copolymer in an experimental mammary adenocarcinoma in C57BL6 mice**

**V.Yu. Balabanyan, V. Bojat, G.D. Kapanadze, Ya.M. Hamdy, V.I. Shvets**

Potent cytotoxic effect of nanoparticulate paclitaxel was revealed in vivo against P-glycoprotein expressing mammary adenocarcinoma Ca755 in C57BL6 mice.

**Key words:** nanoparticles, paclitaxel, mammary adenocarcinoma, P-glycoprotein.