

Морфологическая характеристика нефротоксического действия доксорубина и наносомальной формы поли-лактид-ко-гликолид (PLGA)-доксорубина

И.С. Цветков¹, Н.А. Золотова¹, А.М. Косырева¹, Д.Ш. Джалилова¹, В.В. Куделькина¹, В.П. Черников¹, В.А. Мхитаров¹, Л.П. Михайлова¹, Н.И. Соболева², В.А. Разживина³, М.Т. Добрынина⁴, С.Э. Гельперина^{3,5}, О.В. Макарова^{1,4}

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва, Россия

² ФГБУ Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия

³ ООО «Технология лекарств», Химки, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Доксорубин – противоопухолевый химиотерапевтический препарат, который оказывает кардиотоксическое, гепатотоксическое и нефротоксическое действие. Для снижения токсических эффектов доксорубина разработана его наносомальная форма – PLGA-доксорубин (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)). PLGA – биоразлагаемый полимер, применяемый как средство доставки лекарственных веществ. Нефротоксическое действие PLGA-доксорубина не изучено. Цель исследования – провести в эксперименте сравнительную оценку нефротоксического эффекта терапевтических доз доксорубина в стандартной форме (Докс) или PLGA-доксорубина (PLGA-Докс).

Материалы и методы. Половозрелым самцам крыс Вистар внутривенно трехкратно вводили раствор Докс или PLGA-Докс в терапевтической дозе 1,75 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 8-е и 21-е сутки. Проводили морфологическое, гистохимическое и ультраструктурное исследование почки.

Результаты. При воздействии Докс или PLGA-Докс в почках на 8-е и 21-е сутки эксперимента при гистологическом и ультраструктурном исследовании были выявлены дистрофические изменения проксимальных канальцев с разрушением щеточной каемки, в дистальных канальцах и собирательных трубочках – белковые цилиндры. Дистрофические изменения на 21-е сутки были более выражены, чем на 8-е. В оба срока эксперимента PLGA-Докс вызывал менее выраженные дистрофические изменения эпителия, чем при введении Докс, что подтверждается морфометрической оценкой числа проксимальных канальцев с разрушенной щеточной каемкой.

Заключение. Наносомальная форма PLGA-доксорубин по сравнению с доксорубином в стандартной форме оказывает менее выраженное нефротоксическое действие.

Ключевые слова: нефротоксическое действие, доксорубин, наночастицы, PLGA, морфология

Для корреспонденции: Иван Сергеевич Цветков. E-mail: davedm66@gmail.com

Для цитирования: Цветков И.С., Золотова Н.А., Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Куделькина В.В., Черников В.П., Мхитаров В.А., Михайлова Л.П., Соболева Н.И., Разживина В.А., Добрынина М.Т., Гельперина С.Э., Макарова О.В. Морфологическая характеристика нефротоксического действия доксорубина и наносомальной формы поли-лактид-ко-гликолид (PLGA)-доксорубина. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):77–86. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.77-86.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Развитие фармакологической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (государственный контракт № 13411.1008799.13.144).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 02.09.2021. Получена после рецензирования 17.09.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Morphological characteristics of nephrotoxicity of doxorubicin and doxorubicin PLGA-nanoparticles

I.S. Tsvetkov¹, N.A. Zolotova¹, A.M. Kosyreva¹, D.Sh. Dzhailova¹, V.V. Kudelkina¹, V.P. Chernikov¹, V.A. Mkhitarov¹, L.P. Mikhailova¹, N.I. Soboleva², V.A. Razzhivina³, M.T. Dobrynina⁴, S.E. Gelperina^{3,5}, O.V. Makarova^{1,4}

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russia

³ LLC Drugs Technology, Khimki, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

Introduction. Doxorubicin is an anticancer chemotherapy drug that has cardiotoxic, hepatotoxic, and nephrotoxic effects. To reduce the toxic effects of doxorubicin, its nanosomal form, PLGA-doxorubicin [Poly(Lactico-Glycolic Acid)], has been developed. PLGA is a biodegradable polymer used as a drug delivery system. The nephrotoxic effects of PLGA-doxorubicin have not been studied yet. The aim was to compare the nephrotoxic effects of therapeutic doses of doxorubicin in standard form (Dox) and PLGA-doxorubicin (PLGA-Dox).

Materials and methods. Mature male Wistar rats were injected intravenously three times with Dox or PLGA-Dox solution, at a therapeutic dose of 1.75 mg/kg. The animals were sacrificed on days 8 and 21. We carried out morphological, histochemical, and ultrastructural studies of the kidneys.

Results. Under the influence of Dox or PLGA-Dox in the kidneys on days 8 and 21 of the experiment, histological and ultrastructural examination revealed dystrophic changes in the proximal tubules with the destruction of the brush border; in the distal tubules and collecting ducts, protein cylinders were located. Dystrophic changes were more pronounced on day 21 than on day 8. During both periods of the experiment, PLGA-Dox caused less pronounced dystrophic changes in the epithelium than Dox that is confirmed by a morphometric assessment of the number of proximal tubules with a destroyed brush border.

Conclusion. The nanosomal PLGA-doxorubicin form has a less pronounced nephrotoxic effect than the classical form of doxorubicin.

Keywords: nephrotoxic effect, doxorubicin, nanoparticles, PLGA, morphology

Corresponding author: Ivan S. Tsvetkov. E-mail: davedm66@gmail.com

For citation: Tsvetkov I.S., Zolotova N.A., Kosyreva A.M., Dzhailova D.Sh., Kudelkina V.V., Chernikov V.P., Mkhitarov V.A., Mikhailova L.P., Soboleva N.I., Razzhivina V.A., Dobrynina M.T., Gelperina S.E., Makarova O.V. Morphological characteristics of nephrotoxicity of doxorubicin and doxorubicin PLGA-nanoparticles. Clin. exp. morphology. 2021;10(S4):77–86. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.77-86 (In Russ.).

Funding. The study was carried out with the financial support of the federal target program “Development of the pharmacological and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond” (state contract No. 13411.1008799.13.144).

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

Received 02.09.2021. Received in revised form 17.09.2021. Accepted 22.09.2021.

Введение

Доксорубин – противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, который оказывает антимиотическое и антипролиферативное действие и широко применяется в терапии многих опухолевых заболеваний [1, 2]. При введении препаратов доксорубина в стандартной форме – доксорубина гидрохлорид растворимый (Докс) – отмечается много побочных эффектов на сердечно-сосудистую систему, пищеварительную систему, кожу, нервную систему и головной мозг [3]. Показано, что Докс оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на сердце, печень, почки, семенники [4]. Одним из наиболее распространенных эффектов антрациклиновых антибиотиков является нефротоксичность [5]. Докс способствует увеличению проницаемости клубочков почки и может вызывать дистрофию эпителия канальцев [6].

Терапевтические и токсические эффекты Докс связаны с тем, что он встраивается в ДНК, ингибируя

топоизомеразу IIb. Его молекулы подвергаются восстановлению до семихинона, вызывая образование активных форм кислорода с развитием окислительного стресса [7]. Докс метаболизируется преимущественно в печени и выводится с желчью (40%) в течение 5 дней, а около 12% препарата элиминируется почками с мочой в течение 7 дней [8].

Для снижения токсических эффектов доксорубина и сохранения его высокой противоопухолевой активности разрабатываются различные системы доставки – липосомы, гидрогели и наночастицы. Одним из наиболее распространенных и перспективных полимеров, используемых для изготовления высокоэффективных систем доставки лекарств, является сополимер молочно-гликолевой (молочной и гликолевой) кислоты – PLGA наночастицы [7–10]. Выбор PLGA обусловлен тем, что этот полимер биосовместим и биоразлагаем; мономеры PLGA – молочная и гликолевая кислоты, относятся к числу естественных метаболитов цикла

трикарбоновых кислот [9, 10]. PLGA демонстрирует широкий диапазон времени гидролиза молекулы и ее выведения, а также позволяет изменять форму и размер наночастиц. Применение полимера PLGA одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским медицинским агентством (European Medicines Agency) [11–13]. Доксорубин в составе PLGA-наночастиц (PLGA-Докс) по сравнению с Докс оказывает менее выраженное воздействие на печень и сердце [14]. При этом не изучено влияние терапевтических доз PLGA-Докс на почки.

Цель работы – провести в эксперименте сравнительную оценку нефротоксического эффекта терапевтических доз доксорубина и PLGA-доксорубина.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 24 половозрелых самцах крыс Вистар массой тела 220–240 граммов (филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). Животных перед началом эксперимента выдерживали на карантине в течение 14 суток, содержали в виварии в условиях естественного освещения при комнатной температуре, относительной влажности 35–65% в клетках типа Т4, доступ к корму и воде *ad libitum*. Эксперимент проводили с соблюдением прав и принципов, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына (протокол № 24 от 29.03.2021). Животным внутривенно трехкратно, на 1-е, 3-е и 5-е сутки эксперимента, в терапевтической дозе 1,75 мг/кг вводили раствор Докс (доксорубин гидрохлорид растворимый, Teva, Израиль) ($n=10$) или PLGA-Докс (доксорубин в составе полилактидгликолидных частиц (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)) (ООО «Технология лекарств», Россия) ($n=10$). Животных выводили из эксперимента (по пять особей в группе Докс и PLGA-Докс) на 8-е и 21-е сутки передозировкой золетила 15 мг/кг (Virbac, Франция). Контрольная группа была представлена четырьмя интактными крысами.

Для морфологического исследования забирали правую почку и разрезали ее продольно. Одну половину фиксировали в 10% нейтральном формалине (Biovitrum, Россия). Обезживание, проводку в спиртах возрастающих концентраций, ксилоле и парафине осуществляли в автоматизированном гистологическом процессоре Tissue-Tek VIP 5 Jr (Sakura, Япония), заливку блоков проводили в аппарате Tissue-Tek TEC-5 (Sakura, Япония). Срезы изготавливали на ротационном микротоме Microm GmbH HM-340 (Thermo Scientific, Германия). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. С целью выявления щеточной каемки в эпителии канальцев почки проводили ШИК-реакцию. Для заключения гистологических препаратов использовали

синтетическую монтирующую среду (Biovitrum, Россия).

Вторую часть почки использовали для оценки ультраструктурных изменений. Вырезали фрагмент ткани на границе коркового и мозгового вещества размерами не более $3 \times 3 \times 3$ мм, фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде на фосфатном буфере (0,1M pH 7,3) в течение 2 часов. После двукратного промывания в 0,1M фосфатном буфере фиксировали в 1% растворе OsO_4 в течение 60 минут при температуре $+4^\circ C$. Далее проводили обезживание в спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь Epon-Araldite. Полутонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме 8800 Ultratome III (LKB, Швеция) с помощью стеклянных ножей, окрашивали метиленовым синим и исследовали их под световым микроскопом. Выбирали интересующую область, затачивали эпоновый блок и изготавливали ультратонкие срезы, которые монтировали на сетки для электронной микроскопии. Исследование образцов проводили на просвечивающем электронном микроскопе TEM Libra120 (Carl Zeiss, Германия). Для определения размера наночастиц препарат PLGA-Докс наносили на сетки для электронной микроскопии и проводили негативное контрастирование раствором Рейнольдса, на фотоснимках с электронного микроскопа измеряли диаметры наночастиц в программе ImageJ.

Для определения тяжести поражения проксимальных канальцев почки оценивали долю канальцев со слабой ШИК-реакцией и разрушением щеточной каемки. В каждом наблюдении просматривали 500 канальцев.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Данные проверяли на соответствие нормальному распределению методом Колмогорова–Смирнова. Для сравнения применяли непараметрический критерий Конновера. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (L25; U75). Различия между показателями считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Клиническая эффективность PLGA-Докс и его токсические эффекты во многом определяются размерами наночастиц, от которых зависят их биодegradация и распределение в кровотоке [15]. С помощью электронной микроскопии мы оценили размеры наночастиц PLGA-Докс. Диаметр наночастиц варьировал от 20 до 240 нм, преобладали частицы диаметром 20–100 нм (92%) (рис. 1).

При морфологическом исследовании у животных контрольной группы патологические изменения в почках не выявлены (рис. 2 А–С, 3 А–С, 4 А). Клубочки почки у всех животных этой группы были с неравномерным полнокровием капиллярных петель. Просветы капсулы Шумлянско–Боумена узкие, свободные от содержимого, эпителий наружного листка плоский. Просветы проксимальных и прямых извитых каналь-

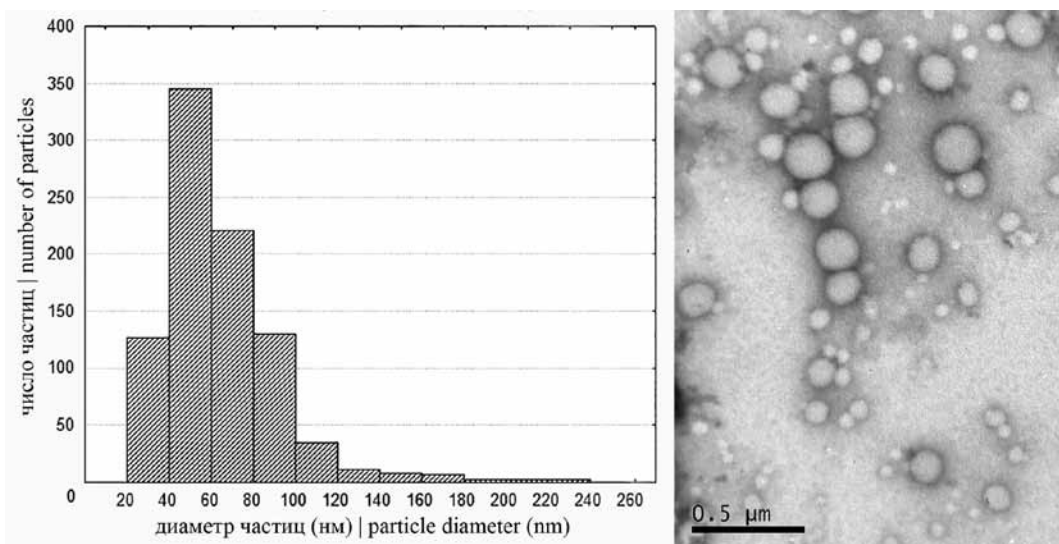


Рис. 1. Распределение микрочастиц PLGA по размеру (n=886), ТЭМ
 Fig. 1. PLGA nanoparticles size distribution (n=886), TEM

цев узкие, а в части из них они не определяются, щеточная каемка ярко эозинофильная, с выраженной равномерной ШИК-положительной реакцией. Петли Генле выстланы уплощенным эпителием, их просветы свободные. Дистальные извитые и прямые канальцы с широкими свободными просветами, эпителий кубический с четко контурируемыми границами ядра и цитоплазмы, включая ее люминальную поверхность. Собирательные трубочки с широкими просветами без содержимого, выстланы плоским эпителием. Просветы лоханки у всех крыс контрольной группы свободные, выстланы плоским эпителием, в собственной пластинке слизистой оболочки выявлены единичные лимфоциты. В рыхлой строме коркового вещества у трех крыс небольшие скопления лимфоцитов и гистиоцитов. Строма мозгового вещества рыхлая, представлена продольно ориентированными пучками тонких коллагеновых волокон. При ультраструктурном исследовании эпителиоциты проксимальных и дистальных канальцев и собирательных трубочек имели нормальное строение.

На 8-е сутки эксперимента у всех животных после введения Докс (рис. 2 D–F, 3 D–F, 4 B) и PLGA-Докс (рис. 2 G–I, 3 G–I, 4 C) клубочки почки с полнокровными капиллярными петлями. Просветы многих проксимальных извитых и прямых канальцев были расширены, в них выявлены единичные десквамированные эпителиальные клетки и небольшие отложения зернистых масс, наблюдали снижение интенсивности ШИК-реакции и разрушение щеточной каемки. Просветы дистальных извитых и прямых канальцев расширены, во многих из них на светооптическом уровне выявлены зернистое содержимое и десквамированный эпителий, люминальная поверхность эпителиоцитов с нечеткими границами. В просветах собирательных трубочек были гомогенные зернистые эозинофильные массы (цилиндры). В корковом веществе у четырех из пяти крыс в каждой экспериментальной группе наблюдались

множественные очаги лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрации. При ультраструктурном исследовании в проксимальных канальцах обнаружено повреждение щеточной каемки, в дистальных канальцах и собирательных трубочках – набухание ядер эпителиоцитов, образование крупных вакуолей в цитоплазме клеток, десквамация эпителия.

При морфологическом исследовании на 21-е сутки эксперимента у животных после введения Докс (рис. 2 J–L, 3 J–L, 4 D) и PLGA-Докс (рис. 2 M–O, 3 M–O, 4 F) наблюдались клубочки почек с неравномерным расширением капиллярных петель и интрагломерулярного пространства. В отдельных клубочках интрагломерулярные пространства были заполнены гомогенными эозинофильными массами. Проксимальные извитые и прямые канальцы с расширенными просветами, разрушенной щеточной каемкой. В проксимальных и дистальных прямых и извитых канальцах и петлях Генле выявлены эозинофильные массы и десквамированный эпителий. Границы люминальной поверхности эпителиоцитов дистальных канальцев нечеткие. Во многих собирательных трубочках обнаружены цилиндры. Отмечались диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация коркового вещества и отек стромы мозгового. Выявленные патоморфологические изменения были более выраженными у животных, которым вводили Докс в стандартной форме, по сравнению с PLGA-Докс. При ультраструктурном исследовании наблюдались нарушение структуры щеточной каемки в проксимальных канальцах, появление крупных вакуолей в цитоплазме и некроз эпителиальных клеток дистальных канальцев и собирательных трубочек, заполнение просветов дистальных канальцев и собирательных трубочек волокнистыми структурами и фрагментами гибнущих клеток.

Морфометрическое исследование доли проксимальных канальцев с нарушением щеточной каемки показало, что на 21-е сутки выраженность этих изменений

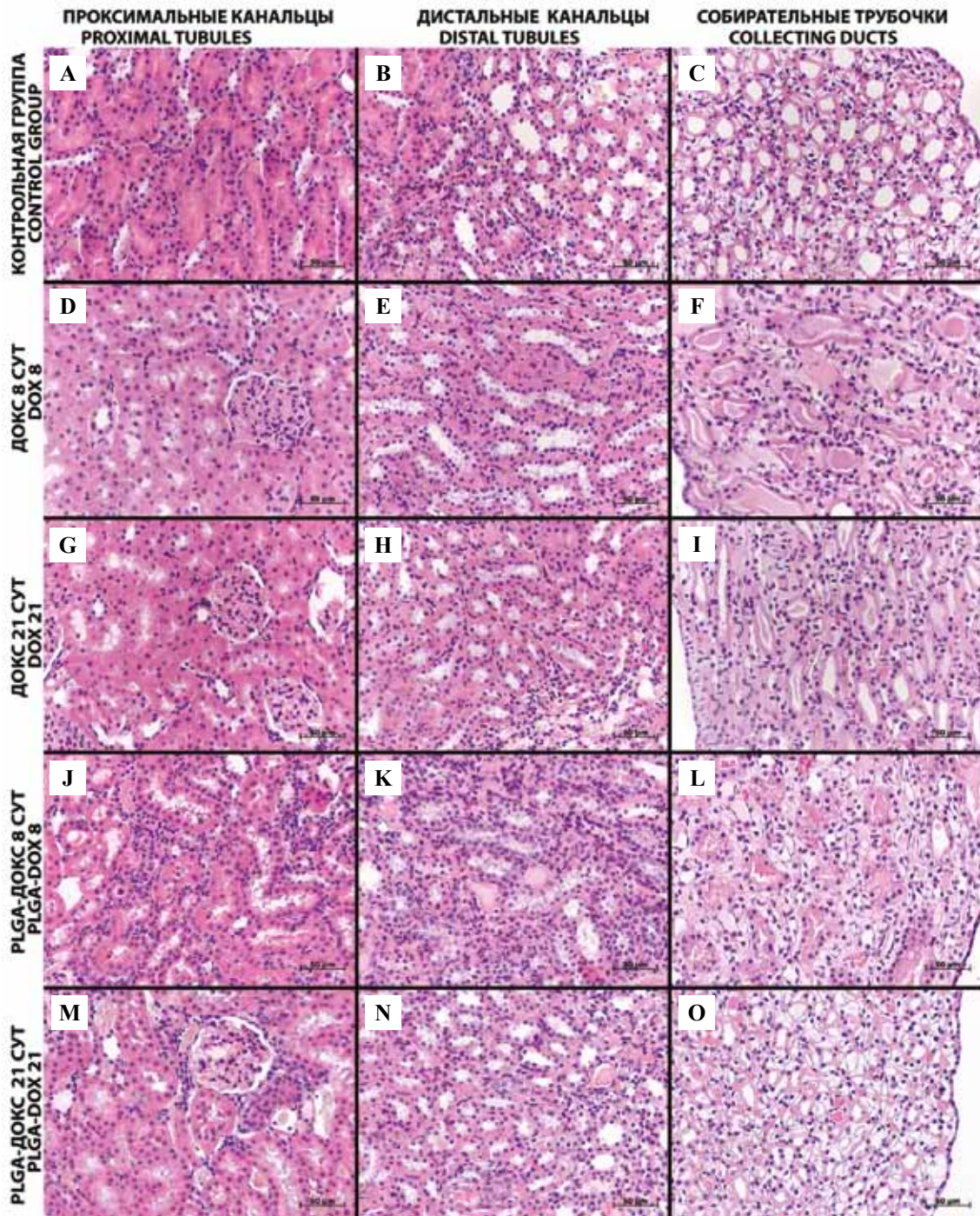


Рис. 2. Столбцы: 1) – проксимальные канальцы, 2) дистальные канальцы, 3) собирательные трубочки. Строки: 1) контроль, 2) Докс, 8-е сутки, 3) PLGA-Докс, 8-е сутки, 4) Докс, 21-е сутки, 5) PLGA-Докс, 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. А, В, С – патологические изменения отсутствуют, D, G, J, М – просветы проксимальных канальцев расширены, щеточная каемка разрушена. Е, Н, К, N – просветы дистальных канальцев расширены, в них зернистое содержимое, десквамированный эпителий. С – контрольная группа, собирательные трубочки выстланы уплощенным эпителием, просветы свободны. F, I, L, O – просветы собирательных трубочек расширены, в них гомогенные и зернистые эозинофильные массы

Fig. 2. Columns: 1) proximal tubules, 2) distal tubules, 3) collecting ducts. Lines: 1) control, 2) DOX day 8, 3) PLGA-doxorubicin day 8, 4) DOX day 21, 5) PLGA-doxorubicin day 21. H&E stain. A, B, C – no pathological changes, D, G, J, M – the lumens of the proximal tubules are dilated; the brush border is destroyed. E, H, K, N – the lumens of the distal tubules are dilated and filled with granular contents and desquamated epithelium. C – control group, collecting ducts are lined with flattened epithelium, the lumens are empty. F, I, L, O – the lumens of the collecting ducts are dilated and filled with homogeneous and granular eosinophilic masses

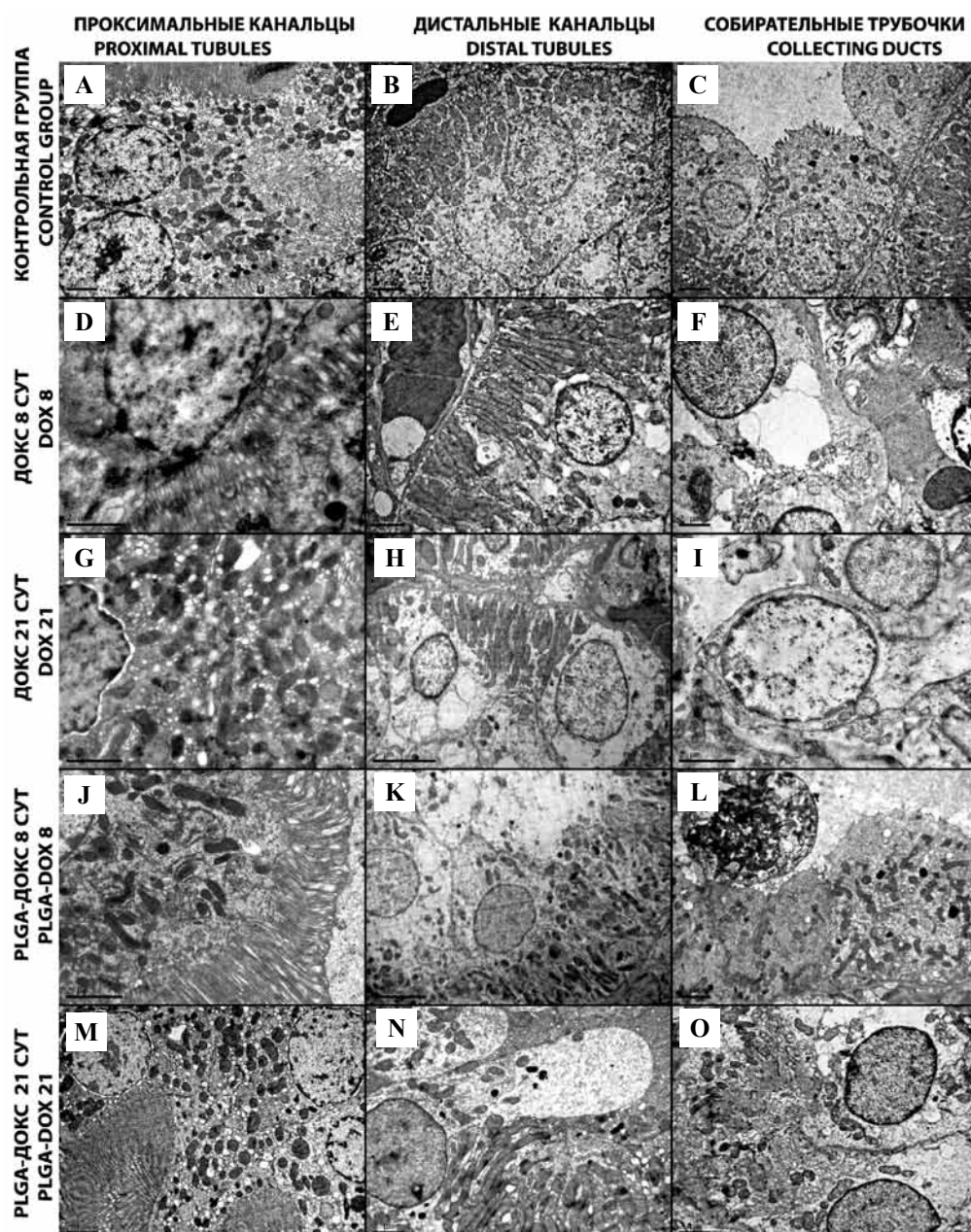


Рис. 3. Столбцы: 1) – проксимальные каналцы, 2) дистальные каналцы, 3) собирательные трубочки. Строки: 1) контроль, 2) Докс, 8-е сутки, 3) PLGA-Докс, 8-е сутки, 4) Докс, 21-е сутки, 5) PLGA-Докс, 21-е сутки. А–С – у животных контрольной группы эпителиоциты проксимальных и дистальных каналцев и собирательных трубочек почки имеют нормальное строение, просветы свободные. D, G – повреждение щеточной каемки в проксимальных каналцах при воздействии Докс. J, M – эпителиоциты проксимальных каналцев без выраженных изменений при воздействии PLGA-Докс. E, K – крупные вакуоли в цитоплазме эпителиоцитов дистальных каналцев на 8-е сутки у животных экспериментальных групп. H, N – разрушение апикальной части клеток (некроз) и заполнение просвета дистального каналца почки фрагментами гибнущих клеток у животных экспериментальных групп на 21-сутки. E – вакуолизация цитоплазмы и разрушение митохондрий, I – отек ядра, L – десквамированная клетка в просвете, O – заполнение просвета фрагментами разрушенных клеток в собирательных трубочках животных опытных групп

Fig. 3. Columns: 1) proximal tubules, 2) distal tubules, 3) collecting ducts. Lines: 1) control, 2) DOX, day 8, 3) PLGA-doxorubicin, day 8, 4) DOX, day 21, 5) PLGA-doxorubicin, day 21. A–C – in the control group, the epithelial cells of the proximal and distal tubules and collecting tubules of the kidney have a normal structure, the lumens are empty. D, G – damaged brush border of the proximal tubules due to Dox exposure. J, M – epithelial cells of the proximal tubules without pronounced changes due to PLGA-Dox exposure. E, K – large cytoplasmic vacuoles in the epithelial cells of the distal tubules on day 8 in animals of the experimental groups. H, N – destruction of the apical part of cells (necrosis); the lumens of the distal tubules of the kidney are filled with fragments of dying cells in animals of the experimental groups on day 21. E – cytoplasmic vacuolization and destruction of mitochondria, I – edema of the nucleus, L – desquamated cell in the lumen, O – the lumen is filled with fragments of destroyed cells in the collecting ducts in the animals of the experimental groups

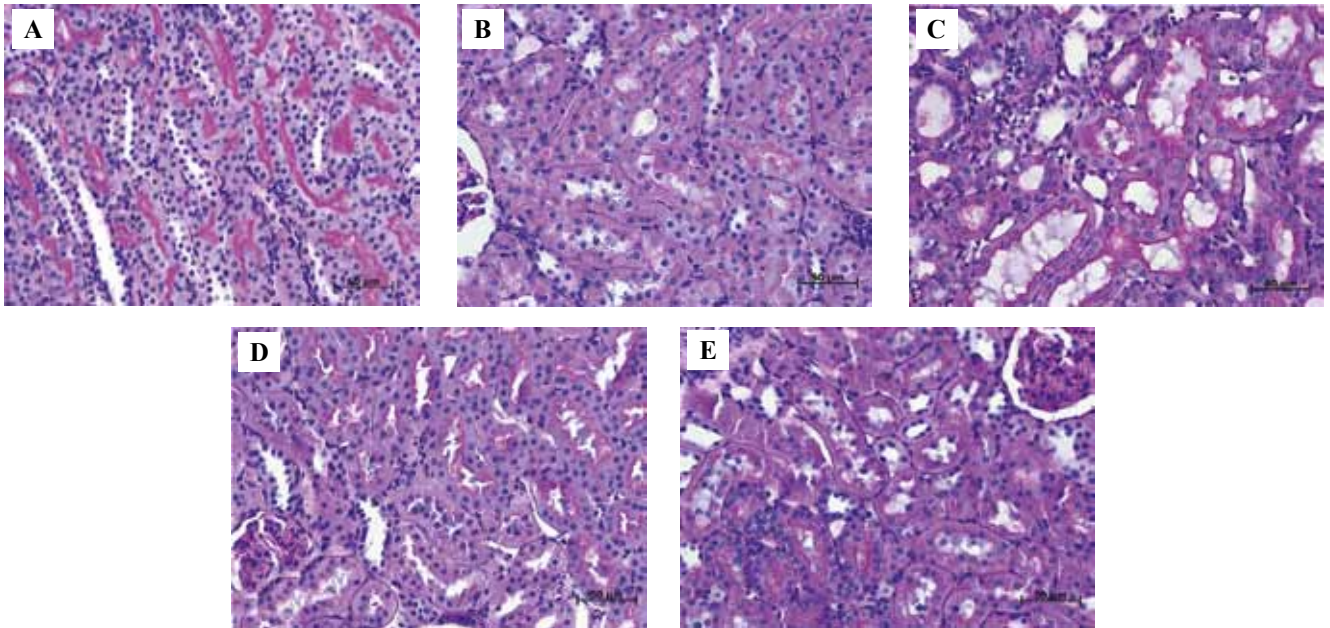


Рис. 4. Щеточная каемка в проксимальных канальцах почки. Контрольная группа (А), Докс, 8-е сутки (В), Докс, 21-е сутки (С). PLGA-доксорубин, 8-е сутки (D), PLGA-доксорубин, 21-е сутки (E). ШИК-реакция, гематоксилин. А – контрольная группа – щеточная каемка проксимальных канальцев почки определяется на всем протяжении, ШИК-реакция выражена. В, С, D, E – просветы проксимальных канальцев почки расширены, щеточная каемка слабо ШИК-положительна и разрушена

Fig. 4. Proximal tubules in rats of the control group (A), DOX, day 8 (B), DOX, day 21 (C), PLGA-doxorubicin, day 8 (D), PLGA-doxorubicin, day 21 (E). PAS-staining, hematoxylin. A – control group: the brush border of the proximal kidney tubules is determined along its entire length, the PAS-response is pronounced. B, C, D, E – the lumens of the proximal kidney tubules are dilated; the brush border is weakly PAS-positive and destroyed

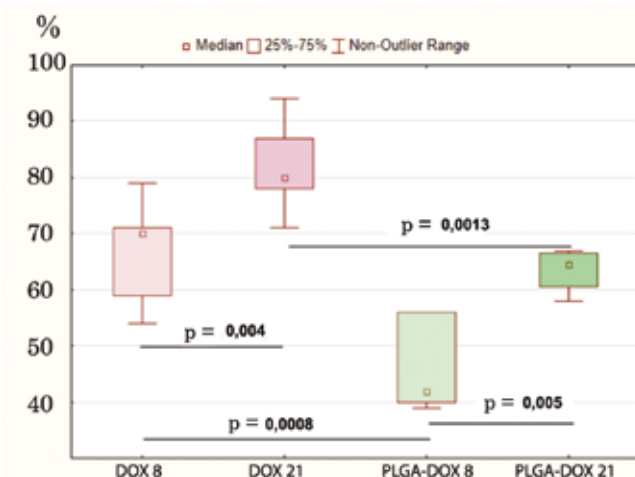


Рис. 5. Доля проксимальных извитых и прямых канальцев почки с нарушенной щеточной каемкой у крыс после введения доксорубина (DOX) и PLGA-Докс (PLGA-DOX) на 8-е и 21-е сутки

Fig. 5. The part of proximal convoluted and straight kidney tubules with a damaged brush border in rats treated with doxorubicin (DOX) and PLGA-doxorubicin (PLGA-DOX) on days 8 and 21

выше, чем на 8-е сутки, и что в оба срока нефротоксическое действие Докс более выражено, чем у PLGA-Докс (рис. 4, 5).

Обсуждение

Для снижения общей токсичности и обеспечения эффективной доставки доксорубина в опухоли используют различные носители, в том числе липосомы и наночастицы [15–20]. Согласно данным литературы, гепатотоксичность и кардиотоксичность менее выражены у PLGA-Докс, чем у Докс [15–17]. Как было показано ранее в нашей работе, PLGA-Докс не изменяет качественные патоморфологические характеристики кардиотоксичности, но приводит к снижению распространенности и выраженности воспалительных альтеративных изменений в печени и сердце [21]. По данным P. Shivakumar et al., четырехкратное введение Докс интактным крысам Вистар вызывает дистрофические изменения канальцев почки [22]. При этом в литературе отсутствуют сведения о нефротоксическом эффекте терапевтических доз PLGA-Докс по сравнению с Докс.

Нами показано, что при введении как Докс, так и PLGA-Докс у животных в почках развиваются дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных извитых и прямых канальцев, очаговая лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация в корковом веществе почек, разрушение щеточной каемки и сниже-

ние содержания в ней гликопротеинов в проксимальных канальцах. Выявленные изменения прогрессируют от 8-х к 21-м суткам. Использование наносомальной формы Докс снижает его нефротоксические эффекты в оба срока.

Нами использован в качестве носителя доксорубицина PLGA – наночастицы, которые в настоящее время широко применяются в качестве системы доставки лекарственных средств. Отрицательно заряженные частицы PLGA имеют гладкую поверхность, они относительно устойчивы к изменению pH и осмотического давления, медленно высвобождают иммобилизованные лекарственные средства путем гидролиза [23, 24]. Снижение нефротоксического эффекта наносомальной формы доксорубицина связано с медленной скоростью высвобождения из PLGA частиц, что снижает его пиковые концентрации в крови и первичной моче [25]. Таким образом, нами впервые показано, что использование наносомальной формы PLGA-Докс снижает нефротоксические эффекты доксорубицина.

Заключение

При трехкратном введении терапевтической дозы доксорубицина в стандартной форме и доксорубицина в составе PLGA-наночастиц как на 8-е, так и на 21-е сутки эксперимента в почках выявлены дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных извитых и прямых канальцев, очаговая лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация в корковом веществе почек. В проксимальных канальцах обнаружены разрушение щеточной каемки и снижение содержания в ней гликопротеинов.

По сравнению с доксорубицином в стандартной форме при введении PLGA-доксорубицина доля проксимальных канальцев с разрушенной щеточной каемкой статистически значимо ниже как на 8-е сутки, так и на 21-е.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – О.В. Макарова, В.А. Разживина.
Сбор и обработка материала – Н.А. Золотова, В.П. Черников, И.С. Цветков, В.В. Куделькина.
Статистическая обработка данных – В.А. Мхитаров.
Написание текста – О.В. Макарова, И.С. Цветков, Л.П. Михайлова.
Редактирование – О.В. Макарова, А.М. Косырева, Д.Ш. Джалилова, М.Т. Добрынина, Н.И. Соболева, С.Э. Гельперина.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – O.V. Makarova, V.A. Razzhivina.
Collected and processed the data – N.A. Zolotova, V.P. Chernikov, I.S. Tsvetkov, V.V. Kudelkina.
Statistical analysis – V.A. Mkhitarov.
Wrote the paper – O.V. Makarova, I.S. Tsvetkov, L.P. Mikhailova.
Edited the manuscript – O.V. Makarova, A.M. Kosyreva, D.Sh. Dzhaililova, M.T. Dobrynina, N.I. Soboleva, S.E. Gelperina.

Литература/References

1. Torres-Roman JS, Lopez-Abente G, Sanz-Anquela JM. Risk of malignant mesothelioma in Spain from environmental asbestos exposure. *Ann Oncol.* 2017;28(Suppl. 5):514. DOI: 10.1093/annonc/mdx385.
2. Choi Y, Yoon HY, Kim J, Yang S, Lee J, Choi JW et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for cancer therapy: Molecular weight effect of PLGA in doxorubicin release for controlling immunogenic death. *Pharmaceutics.* 2020;12(12):1165. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121165.
3. Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, Jacob JA, Karuppusamy I et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci.* 2018;200:26–30. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.03.023.
4. Elbaky NAA, Ali AA, Ahmed RA. Cardioprotective effect of simvastatin on doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *J Basic Appl Sci.* 2010;6(1):29–38.
5. Oktem G, Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G, Cengiz M, Eser M et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: Protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol.* 2011;2011:390238. DOI: 10.1155/2011/390238.
6. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton).* 2011;16(1):30–8. DOI:10.1111/j.1440-1797.2010.01383.x
7. Jawad B, Poudel L, Podgornik R, Steinmetz NF, Ching WY. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys Chem Chem Phys.* 2019;21(7):3877–93. DOI: 10.1039/C8CP06776G.
8. van der Zanden SY, Qiao X, Neefjes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *FEBS J.* 2020 [published online ahead of print]. DOI: 10.1111/FEBS.15583.
9. Yildiz T, Gu R, Zauscher S, Betancourt T. Doxorubicin-loaded protease-activated near-infrared fluorescent polymeric nanoparticles for imaging and therapy of cancer. *Int J Nanomedicine.* 2018;31:6961–86. DOI: 10.2147/IJN.S174068.
10. Park K, Otte A, Sharifi F, Garner J, Skidmore S, Park H et al. Formulation composition, manufacturing process, and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *J Control Release.* 2021;329:1150–61. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.10.044.
11. Essa D, Kondiah PPD, Choonara YE, Pillay V. The design of Poly(lactide-co-glycolide) nanocarriers for medical applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:48. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00048.
12. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3(3):1377–97. DOI:10.3390/polym3031377.
13. Steiniger SCJ, Kreuter J, Khalansky AS, Skidan IN, Bobruskin AI, Smirnova ZS et al. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int J Cancer.* 2004;109:759–67. DOI 10.1002/ijc.20048.
14. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MN. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2007;119(1):77–85. DOI:10.1016/j.jconrel.2007.01.016.

15. Федосеева В.В., Халанский А.С., Мхитаров В.А., Цветков И.С., Малиновская Ю.А., Максименко О.О. и др. Противоопухолевая активность доксорубина в составе наночастиц при экспериментальной глиобластоме. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017;2(22):65–71. Fedoseeva VV, Khalansky AS, Mkhitarov VA, Tsvetkov IS, Malinovskaya YA, Maksimenko OO et al. Anti-tumor activity of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in the experimental glioblastoma. Clinical and experimental morphology. 2017;22(2):65–71 (In Russ.).
16. Kumskova N, Ermolenko Y, Osipova N, Semyonkin A, Kildeeva N, Gorshkova M et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release. J Microencapsul. 2020;37(3):283–95. DOI: 10.1080/02652048.2020.1729885.
17. McGuire WP, Penson RT, Gore M, Herraes AC, Peterson P, Shahir A et al. Randomized phase II study of the PDGFR α antibody olaratumab plus liposomal doxorubicin versus liposomal doxorubicin alone in patients with platinum-refractory or platinum-resistant advanced ovarian cancer. BMC Cancer. 2018;18(1):1292. DOI: 10.1186/s12885-018-5198-4.
18. Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, Osipova N, Razzhivina V, Arantseva D et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. Int J Pharm. 2019;572:118733. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733.
19. Gao J, Liu J, Xie F, Lu Y, Yin C, Shen X. Co-delivery of docetaxel and salinomycin to target both breast cancer cells and stem cells by PLGA/TPGS nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2019;14:9199–216. DOI: 10.2147/IJN.S230376.
20. Deepika MS, Thangam R, Sheena TS, Vimala RTV, Sivasubramanian S, Jeganathan K et al. Dual drug loaded PLGA nanospheres for synergistic efficacy in breast cancer therapy. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;103:109716. DOI:10.1016/j.msec.2019.05.001.
21. Куделькина В.В., Халанский А.С., Макарова О.В., Цветков И.С., Косырева А.М., Алексеева А.И. и др. Сравнительная морфологическая и биохимическая характеристика токсического действия доксорубина и наносомальной формы PLGA-доксорубина при лечении экспериментальной глиобластомы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):58–65. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65. Kudelkina VV, Khalanskiy AS, Makarova OV, Tsvetkov IS, Kosyreva AM, Alekseeva AI et al. Comparative morphological and biochemical characteristics of the toxic effects of doxorubicin and nanosomal plga-doxorubicin form in the experimental glioblastoma treatment. Clinical and experimental morphology. 2021;10(1):58–65 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65.
22. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. Toxicol Int. 2012;19(3):241–4. DOI: 10.4103/0971-6580.103656.
23. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. J Control Release. 2012;20;161(2):505–22. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
24. Kovshova T, Osipova N, Alekseeva A, Malinovskaya J, Belov A, Budko A et al. Exploring the interplay between drug release and targeting of lipid-like polymer nanoparticles loaded with doxorubicin. Molecules. 2021;5;26(4):831. DOI: 10.3390/molecules2604083.
25. Allahyari M, Mohit E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. Hum Vaccin Immunother. 2016;12(3):806–28. DOI: 10.1080/21645515.2015.1102804.

Информация об авторах

Иван Сергеевич Цветков – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Наталья Александровна Золотова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Анна Михайловна Косырева – доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейроморфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Джулия Шавкатовна Джалилова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Вера Владимировна Куделькина – научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Валерий Петрович Черников – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Владимир Аршакович Мхитаров – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Лилия Петровна Михайлова – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Наталья Игоревна Соболева – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории контроля качества лекарственных средств Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов.

Виктория Александровна Разживина – кандидат биологических наук, руководитель отдела клинических исследований ООО «Технология лекарств».

Мариэтта Тиграновна Добрынина – кандидат биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Светлана Эммануиловна Гельперина – доктор химических наук, заведующая лабораторией систем доставки лекарств ООО «Технология лекарств»; профессор кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева.

Ольга Васильевна Макарова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына; профессор биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Author information

Ivan S. Tsvetkov – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>

Natalia A. Zolotova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0119-9889>

Anna M. Kosyreva – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Neuromorphology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-6182-1799>

Dzhuliia Sh. Dzhililova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Vera V. Kudelkina – Researcher, Laboratory of Neuromorphology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-2620-7427>

Valeriy P. Chernikov – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Experimental Cell Pathology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-3253-6729>

Vladimir A. Mkhitarov – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-4427-1991>

Liliya P. Mikhailova – Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0479-8684>

Natalia I. Soboleva – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Quality Control of Drugs, The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality.

<https://orcid.org/0000-0003-2558-4113>

Victoria A. Razzhivina – Cand. Sci. (Biol.), RCO Manager, LLC Drugs Technology.

<https://orcid.org/0000-0002-7826-9937>

Marietta T. Dobrynina – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University.

<https://orcid.org/0000-0003-0361-1184>

Svetlana E. Gelperina – Dr. Sci. (Chem.), Head of the Drug Delivery System Laboratory, LLC Drugs Technology; Professor of the Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia.

<https://orcid.org/0000-0003-1113-6715>

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology; Professor of the Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University.

<https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>