

УДК 577.32, 577.114.083

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *Helianthus tuberosus* L. НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО N-ГЛИКОЗИДА ИНДОЛО[2,3-а]КАРБАЗОЛА ЛХС-1269

© 2024 г. М.П. Киселева^{*,#}, И.С. Голубева^{*}, В.П. Дерягина^{*}, А.В. Ланцова^{*}, Л.В. Эктова^{*},
Е.А. Корнюшенков^{*}, Л.М. Борисова^{*}, Е.А. Генералов^{**}

^{*}Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России,
Каширское шоссе, 24, Москва, 115522, Россия

^{**}Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

[#]E-mail: marina-kiselyova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.05.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

Исследована противоопухолевая активность производного N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1269 с полисахаридом из *Helianthus tuberosus* L. в качестве адъювантного средства на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис мышей гибридов F1(C₅₇Bl/6 × DBA/2). Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухолей леченых животных в сравнении с контрольными. В результате установлено, что терапевтический эффект комбинации оказался выше и продолжительнее, чем при монотерапии, с уменьшением опухолевого роста карциномы легкого Льюис на 53–64% до 28-х суток наблюдения. Применение полисахарида приводило к росту числа клеток крови – лейкоцитов, лимфоцитов и фагоцитов, ответственных за противоопухолевый иммунитет. Химиотерапевтическое воздействие комбинации ЛХС-1269 и полисахарида показало выраженный устойчивый противоопухолевый ответ в отношении карциномы легкого Льюис в системе периферической крови мышей на фоне временного увеличения числа нейтрофилов и моноцитов на 12-е сутки развития опухоли. Очевидно, тестируемые соединения стимулировали пролиферацию нейтрофилов и моноцитов определенных фенотипов с противоопухолевой активностью на более раннем этапе развития карциномы легкого Льюис.

Ключевые слова: полисахарид из *Helianthus tuberosus* L., производное индолокарбазола ЛХС-1269, эпидермоидная карцинома легкого Льюис, противоопухолевая активность.

DOI: 10.31857/S0006302924050164, EDN: MIXNCU

Опухолевые заболевания продолжают оставаться одной из основных проблем в системе здравоохранения стран мира. Несмотря на новые подходы к повышению эффективности лечения онкологических больных: хирургический [1], иммуно- [2], химио- [3], радио- [4], таргетной [5] терапии и другие, сохраняется рост заболеваемости и количество летальных исходов по всему миру [6].

Повышение эффективности химиотерапии злокачественных новообразований реализуется по разным направлениям, одним из которых является изучение и тестирование новых соедине-

ний природного происхождения, их синтетических аналогов и производных в комплексной терапии.

Полисахариды, полученные из природных источников, представляют обширную гетерогенную группу биологических молекул с разнообразными свойствами: иммуномодулирующими, радиопротекторными, адаптогенными, противоопухолевыми и другими [7]. Большая часть этих свойств определяется взаимодействием с различными группами мембранных рецепторов нормальных клеток и трансформированных опухолевых клеток, некоторые полисахариды могут вызывать остановку клеточного цикла, ингибировать синтез ДНК, стимулировать апоптоз, ферроптоз или дифференциацию клеток [8–10].

Сокращения: ЛХС-1269 – 6-пиколинамидо-12-(β-D-ксилопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион, НТLP – полисахарид из *Helianthus tuberosus* L., LLC – карцинома легкого Льюис.

Исследованиями также установлено, что полисахариды изменяют микроокружение опухоли и оказывают влияние на ее адгезивные способности, блокируя транскрипционный фактор NF- κ B и ингибируя экспрессию адгезивных молекул Е-селектинов, используемых опухолью для прикрепления, распространения и метастазирования [11, 12]. Кроме того, обнаружено, что некоторые полисахариды подавляют факторы опухолевого ангиогенеза за счет снижения уровня экспрессии белков VEGF, CD31, CD34 и эндопептидазы MMP 9 [13, 14].

Полисахариды обладают антиканцерогенными свойствами. Участвуя в механизмах иммунорегуляции, они активируют ответственные за противоопухолевый иммунитет иммунокомпетентные клетки, такие как натуральные киллеры, регуляторные, цитотоксические, хелперные и фолликулярные Т-клетки, опухоль-ассоциированные нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки и В-клетки [15, 16]. Противоопухолевые свойства некоторых полисахаридов проявляются посредством активации лимфоцитов, секреции цитокинов TNF- α , интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6 и IL-12 [17, 18].

Таким образом, цитотоксическое и иммуноопосредованное действие полисахаридов на неопластические процессы открывает перспективы для их применения в лечении и профилактике онкозаболеваний [19]. Кроме того, природные полисахариды признаны в качестве адъювантных лекарств [20] в период химио- и лучевой терапии [21]. Известно их применение в комбинированной терапии [22, 23]. В данной работе проводилось исследование полисахарида из *Helianthus tuberosus* L. в комбинации с производным N-гликозид индоло[2,3-а]карбазолом ЛХС-1269.

В научной литературе класс индолокарбазолов представлен многочисленными соединениями, выделенными как из природных источников, так и полученными синтетическим путем [24]. Известно, что препараты на основе производных N-гликозидов индолокарбазолов способны взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и инициировать различные пути гибели опухолевых клеток [25, 26].

Новое противоопухолевое соединение 6-пиколинамидо-12-(β -D-ксилопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1269) синтезировано в лаборатории химического синтеза [27], инъекционная лекарственная форма на основе ЛХС-1269 создана в лаборатории разработки лекарственных форм НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России [28]. Исследованиями *in vitro* установлено, что соединение ЛХС-1269 эффективно влияет на васкулогенную мимикрию, подавляет механизм ангиогенеза,

связанный с фактором роста эндотелия сосудов VEGF, приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли [29, 30].

Высокоочищенный полисахарид НТЛР получен из клубней *Helianthus tuberosus* L. Разветвленная молекула НТЛР имеет молекулярную массу 1–2 МДа с моносахаридным составом из глюкозы, галактозы и уроновых кислот, а также рамнозы, арабинозы, маннозы и ксилозы в следовых количествах, соединенных гликозидными связями β -(1 \rightarrow 3) и β -(1 \rightarrow 4). Полисахарид НТЛР является нетоксичной и не аллергенной молекулой с интерферониндуцирующими свойствами [31]. НТЛР способен стимулировать выработку провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6, а также регулировать уровень IL-1, что приводит к стимуляции натуральных киллеров и увеличению цитотоксического индекса [32], демонстрирует противоопухолевую, антиметастатическую и иммуномодулирующую активность за счет взаимодействия с трансмембранными рецепторами TLR-2/6 и Dectin-1 [33].

Противоопухолевые свойства ЛХС-1269 связаны с изменением экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз, клеточное старение, регуляцию метаболизма в условиях гипоксии, ответом на повреждение ДНК и активацией репарации [34]. Значимая цитотоксическая и противоопухолевая активность ЛХС-1269 показана на линиях раковых клеток человека НСТ-116, НТ-29, МСF-7, А549, U251 [34] и на моделях перевиваемых опухолей мышей – карциноме легкого Льюис (LLC), раке шейки матки РШМ-5, аденокарциноме молочной железы Са-755, аденокарциноме толстого кишечника АКАТОЛ [35].

В ходе экспериментальных исследований на культуре клеток HeLa выявлены эпигенетические эффекты ЛХС-1269. Так, при изучении молекулярных механизмов противоопухолевой активности ЛХС-1269 обнаружено его влияние на метилирование ДНК, локализацию гистона H1, ремоделирование хроматина и реактивацию эпигенетически молчащих генов [36].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполняли на перевиваемой модели опухолевого роста мышей карциноме легкого Льюис. Мышей получали из разведения экспериментально-биологической лаборатории НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Лабораторных животных содержали в клетках из полипропилена с подстилом из опилок, стерилизованных в сухожаровом шкафу, в условиях естественного освещения с контролируемой температурой 18–22 $^{\circ}$ C и влажностью воздуха 65%, на брикетированном корме и с постоянным доступом к воде. Животных содержали в

индивидуально вентилируемых клетках в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [37].

LLC перевивали подкожно по 0.5 мл опухолевой суспензии в виде взвеси в среде 199 в разведении 1 : 10 (5×10^6 клеток) в правую подмышечную впадину мышам-самкам гибридов $F_1(C_{57}Bl/6 \times DBA/2)$ с массой тела 18–22 г. Штамм поддерживали на мышах-самках линии $C_{57}Bl/6$ стандартными серийными перевивками внутримышечно каждые 12–14 суток [38, 39].

Перед лечением мышей распределяли в четыре опытные группы по 16 особей в каждой ($n = 16$), что соответствовало численности животных, достаточной для проведения статистической оценки и расчета показателей достоверности. Число животных в контрольной группе без лечения составляло 20 особей ($n = 20$).

Лечение начинали через 48 ч после перевивки LLC – время, соответствующее интенсивному размножению опухолевых клеток в солидной опухоли и их нахождению в наиболее чувствительном к химиотерапии состоянии.

Показатели периферической крови мышей с LLC (концентрация гемоглобина, гематокрит, количество эритроцитов, тромбоцитов, общее число лейкоцитов) определяли на гематологическом анализаторе Mindray (Китай). Подсчет лейкоцитарной формулы проводили стандартным гематологическим методом [40].

Исследуемые соединения. Лекарственная форма ЛХС-1269 представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и инфузий, с содержанием действующего вещества во флаконе 10 мг. Содержимое каждого флакона разводят водой для инъекций до концентрации 5 мг/мл [28].

НТЛР – порошок беловато-сероватого цвета, без запаха, хорошо растворим в воде и нерастворим в органических растворителях. Ампулы объемом 1 мл содержат стерильный раствор НТЛР в концентрации 0.5 мг/мл, растворитель – 0.9% NaCl.

Возможность повышения эффективности противоопухолевого действия ЛХС-1269 оценивали в комбинации с НТЛР при однократном и пятикратном режиме применения НТЛР в дозе 5 мг/кг внутривенно (в/в) в объеме 0.5 мл на мышь. НТЛР в монотерапии вводили пятикратно в/б в той же дозе и объеме.

Инъекционную лекарственную форму ЛХС-1269 в монотерапии или в комбинации применяли однократно внутривенно (в/в) в дозе 90 мг/кг (терапевтическая доза 120 мг/кг). Дозы и объем

введений рассчитывали на вес каждого животного.

Оценку результатов лечения проводили по показателям торможения роста опухолей (ТРО%) на разные сроки после окончания лечения и вычисляли по формуле:

$$ТРО\% = \frac{V_k - V_0}{V_k} \times 100\%,$$

где V_0 и V_k – средний объем опухолей (mm^3) соответственно в опытной и контрольной группах, который для каждой солидной опухоли определяли как произведение размеров трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла [39].

Показатели эффективности изучаемых препаратов определяли в сравнении с контрольной группой. Минимальным критерием противоопухолевой активности исследуемых соединений считали $ТРО\% \geq 50\%$, принятый для противоопухолевых препаратов [39–42].

Статистическая оценка результатов. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0. Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные показателей периферической крови обрабатывали с использованием доверительных интервалов средних сравниваемых величин. После проверки данных на нормальность с помощью критерия Шапиро–Уилка для малых выборок ($n < 50$), критерия Лиллиефорса с учетом параметров выборочного распределения и K -критерия Д’Агостино использовали t -критерий Стьюдента, статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из табл. 1 следует, что продолжительный противоопухолевый эффект ЛХС-1269 наблюдали в комбинации однократного и пятикратного применения НТЛР ($ТРО\% = 64–59\%$ и $ТРО\% = 59–53\%$ соответственно, $p < 0.05$ к контролю). ЛХС-1269 в монотерапии оказывал противоопухолевое действие до 8-х суток наблюдения на уровне $ТРО\% = 60–52\%$, $p < 0.05$ к контролю, НТЛР в монотерапии проявлял активность в отношении LLC на уровне $ТРО\% = 32–38\%$, что менее 50%. Включение полисахарида НТЛР в схему комбинированного лечения приводило к уменьшению опухолевого роста LLC в группе с ЛХС-1269 (рис. 1). Наблюдение за животными продолжали до 28 суток после окончания лечения.

На следующем этапе исследования провели сравнительную оценку влияния НТЛР, ЛХС-1269 и их комбинаций на систему периферической крови мышей с LLC в условиях химиотерапевти-

Таблица 1. Противоопухолевая эффективность ЛХС-1269, НТЛР в монотерапии и в комбинациях на LLC мышей

№№ п/п	Группа	Путь введения	Доза (мг/кг)/интервал (час) × число введений	ТРО%, %							
				Время после окончания лечения, сут							
				1	4	8	12	16	20	24	28
1	ЛХС-1269	в/в	90 × 1	60 ^{1,2}	48 ^{1,2}	52 ^{1,2}	35	48	40	46	42
2	НТЛР	в/б	5/24 × 5	32	24	34	22	30	30	38	29
3	ЛХС-1269 + НТЛР	в/в + в/б	90 × 1 + 5/24 × 5	59 ^{1,2}	53 ^{1,2}	59 ^{1,2}	49 ¹	58 ^{1,2}	54 ^{1,2}	53 ^{1,2}	49 ^{1,2}
4	ЛХС-1269 + НТЛР	в/в + в/б	90 × 1 + 5 × 1	64 ^{1,2}	42	50 ^{1,2}	34	50 ¹	48 ^{1,2}	50 ^{1,2}	59 ¹

Примечание. ¹ – $p < 0.05$ по отношению к контролю, ² – $p > 0.05$ между группами 1, 3 и 4.

ческого воздействия на 12-е и 20-е сутки после прививки (табл. 2 и 3 соответственно).

Хотя данные показателей общего анализа крови мышей носят предварительный характер и требуют уточняющих экспериментов, некоторые тенденции можно отследить. Прежде всего, стоит отметить, что на 12-е и 20-е сутки показатели общего анализа крови не идентичны, что связано с развитием опухолевого процесса и действием ЛХС-1269 и НТЛР. К 12-м суткам развития опухолевого процесса наблюдается статистически значимое снижения абсолютного числа лейкоцитов в группе ЛХС-1269, при этом в группе с НТЛР и комбинированного применения с ЛХС-1269 их количество выше показателей контрольной группы. Так, например, применение ЛХС-1269 в комбинации с пятикратным введением НТЛР привело к росту числа лейкоцитов в 1.5 раза, в комбинации с однократным введением НТЛР – в 1.3 раза, а в монотерапии НТЛР – в 1.2 раза. К 20-м суткам общее число лейкоцитов во всех группах по сравнению с 12-ми сутками увеличи-

валось до 2.3 раза. При этом стимулирующий эффект НТЛР сохранялся на уровне 1.2 раза, а в группах с ЛХС-1269 количество лейкоцитов снижалось до 1.8 раза в сравнении с контролем.

На 12-е сутки наблюдается увеличение относительного числа лимфоцитов в крови подопытных животных группы НТЛР в монотерапии сравнительно с контролем. Так, например, при сравнении с группой ЛХС-1269 в монотерапии процент лимфоцитов увеличивался до 3.4 раза, а с группой комбинированного применения – до 12 раз. Такое изменение свидетельствует, скорее всего, о стимуляции числа иммунокомпетентных клеток и их миграцией из периферического кровотока к очагу воспаления за счет действия НТЛР. ЛХС-1269 в данном случае вызывает повреждение опухолевой ткани, увеличивая локальное воспаление, а НТЛР стимулирует миграцию лимфоцитов в опухолевый узел. Эту же гипотезу подтверждают данные моноцитов (абсолютные и процентные показатели) – в группе НТЛР в периферическом кровотоке их количество меньше в сравнении с контролем

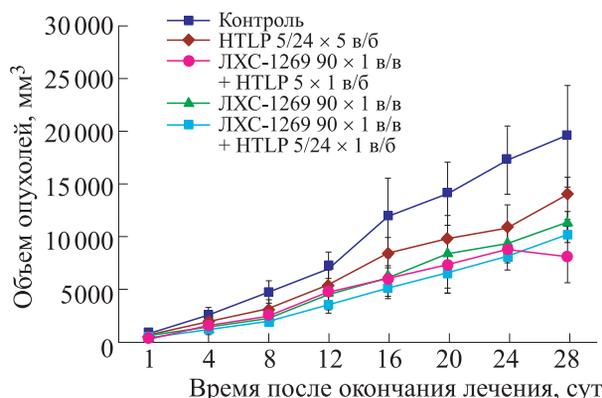
**Рис. 1.** Динамика роста LLC под действием ЛХС-1269 и НТЛР в монотерапии и при комбинированном воздействии.

Таблица 2. Общий анализ крови мышей на 12-е сутки после перевивки LLC и лечения

Клетки крови	Группа животных				
	ЛХС-1269 × 1 (в/в) + + НТЛР × 1 (в/б)	ЛХС-1269 × 1 (в/в) + + НТЛР × 5 (в/б)	НТЛР × 5 (в/б)	ЛХС-1269 × 1 (в/в)	Контроль
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	2.46 ± 0.69*	2.83 ± 0.71**	2.25 ± 0.5*	1.27 ± 0.38*	1.87 ± 0.53
Нейтрофилы, %	64.5 ± 18.6*	75.1 ± 20.7**	36.7 ± 11.4	59.2 ± 14.2**	34.9 ± 7.2
Количество, 10 ⁹ /л	1.59*	2.12**	0.83	0.75	0.65
Лимфоциты, %	9.6 ± 2.9**	4.9 ± 1.6**	59.3 ± 10.6*	17.7 ± 3.4**	45.1 ± 15.3
Моноциты, %	25.4 ± 9.4	19.4 ± 7.8	3.4 ± 2.4**	20.8 ± 7.5	18.2 ± 8.2
Количество, 10 ⁹ /л	0.62	0.55	0.08	0.26	0.34
Эозинофилы, %	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.3	1.5 ± 1.2	1.6 ± 0.9
Базофилы, %	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.2 ± 0.3
Эритроциты, 10 ¹² /л	2.05 ± 0.7	1.51 ± 0.52	1.38 ± 0.37	1.19 ± 0.26	1.63 ± 0.46
Гемоглобин, г/л	31.5 ± 10.5	24.5 ± 8.1	21.5 ± 5.5	19.5 ± 4.4	25.0 ± 7.1
Гематокрит, %	8.75 ± 2.67	6.85 ± 1.85	5.95 ± 1.49	5.2 ± 1.4	6.90 ± 2.14
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	135.0 ± 35.1	137.0 ± 31.5	82.0 ± 23.8*	78.5 ± 26.7*	141.0 ± 38.1
Тромбокрит, %	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.02

Примечание. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ при сравнении с показателями контроля по критерию Стьюдента. Приведены среднеарифметические значения ± стандартное отклонение (SD).

Таблица 3. Общий анализ крови мышей на 20-е сутки после перевивки LLC и лечения

Клетки крови	Группа животных				
	ЛХС1269 × 1 (в/в) + + НТЛР × 1 (в/б)	ЛХС-1269 × 1 (в/в) + + НТЛР × 5 (в/б)	НТЛР × 5 (в/б)	ЛХС-1269 × 1 (в/в)	Контроль
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	2.5 ± 0.78*	2.34 ± 0.75*	4.90 ± 1.23	2.83 ± 0.79**	4.20 ± 1.26
Нейтрофилы, %	53.2 ± 14.4	57.4 ± 21.0	43.4 ± 10.2	55.1 ± 14.9	48.8 ± 12.7
Количество, 10 ⁹ /л	1.33	1.34	2.13	1.56	2.05
Лимфоциты, %	38.1 ± 10.3	28.7 ± 7.2**	45.8 ± 11.0	34.3 ± 6.9*	43.1 ± 13.0
Моноциты, %	7.0 ± 4.9	11.1 ± 4.0**	9.4 ± 3.3**	8.7 ± 3.7	6.5 ± 2.9
Количество, 10 ⁹ /л	0.17	0.26	0.46**	0.25	0.27
Эозинофилы, %	0.5 ± 0.6	1.2 ± 0.8	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.5
Базофилы, %	1.2 ± 0.7	1.6 ± 0.5	0.7 ± 0.3	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.7
Эритроциты, 10 ¹² /л	1.99 ± 0.65	1.97 ± 0.55	2.07 ± 0.60	2.10 ± 0.57	2.13 ± 0.66
Гемоглобин, г/л	31.50 ± 9.77	32.0 ± 9.0	29.0 ± 7.8	34.0 ± 9.0	29.0 ± 8.7
Гематокрит, %	8.90 ± 2.58	9.00 ± 2.43	8.0 ± 2.24	9.40 ± 2.54	8.30 ± 2.41
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	101.0 ± 28.1	54.0 ± 12.7*	94.0 ± 23.5	107.0 ± 28.8	91.0 ± 27.7
Тромбокрит, %	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.02

Примечание. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ при сравнении с показателями контроля по критерию Стьюдента. Приведены среднеарифметические значения ± стандартное отклонение (SD).

в 4.3 раза, а в сравнении с группой ЛХС-1269 — в 3.3 раза. При этом на 20-е сутки количество моноцитов в группе НТЛР было выше контрольного значения в 1.7 раза, а в группе с ЛХС-1269 — в 1.8 раза на раннем этапе опухолевого процесса, что также свидетельствует о стимуляции синтеза моноцитов.

В случае нейтрофилов обращает на себя внимание несоответствие тенденции процентного содержания клеток и абсолютного, что связано с автоматическим пересчетом числа клеток на общее количество. К 12-м суткам комбинированное применение ЛХС-1269 и НТЛР дозозависимо увеличивало количество нейтрофилов у животных до 3.3 раза, к 20-м суткам этот эффект снижался для группы НТЛР до значения, неотличимого от контроля, а в группах с ЛХС оказался в 1.5 и 1.3 раза ниже значений контрольной группы. Стоит отметить, что на начальных этапах опухолевого процесса применение комбинации препаратов стимулирует нейтрофильный ответ, на поздних стадиях этот эффект не наблюдается. Предположительно, такое явление связано со специфическим воздействием ЛХС-1269 на данный тип клеток. С другой стороны, можно предположить, что пятикратного введения НТЛР недостаточно для длительного (3 недели) поддержания выработки нейтрофилов.

Таким образом, экспериментально установлено повышение антипролиферативной активности ЛХС-1269 в комбинации с НТЛР. Комбинированное лечение вызывало синергический противоопухолевый эффект, то есть терапевтический эффект комбинированного применения оказался выше и продолжительнее, чем в тех же дозах при монотерапии.

В настоящем исследовании у мышей с опухолью LLC, которым вводили комбинации ЛХС-1269 и НТЛР, регистрировали выраженный устойчивый противоопухолевый ответ. Одним из предполагаемых механизмов антипролиферативной активности комбинации НТЛР и ЛХС-1269 является прямое действие ЛХС-1269 в качестве химиотерапевтического агента и опосредованное действие НТЛР в качестве адъювантного и иммуномодулирующего средства. Учитывая иммунобиологические и колониестимулирующие свойства полисахарида НТЛР [31], а также эпигенетическую и антиангиогенную активность индолокарбазола ЛХС-1269 [36], есть основания полагать, что в комбинации тестируемые соединения активируют пролиферацию нейтрофилов и моноцитов определенных фенотипов с противоопухолевой активностью на более раннем этапе развития опухолей. Стимулирующее действие НТЛР на антипролиферативную активность ЛХС-1269 сопоставимо с показателями ТРО% в сторону уменьшения опухолевого роста LLC в тот

же период наблюдения. Согласно данным, полученным другими авторами в экспериментах на мышах с LLC, показано, что добавление полисахаридов к полихимиотерапии цисплатином/паклитакселом предотвращало развитие нейтропении, вызванной противоопухолевой терапией, повышая ее эффективность за счет восстановления гранулоцитарного роста кроветворения [22, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение полисахарида НТЛР в качестве адъюванта в схему лечения мышей с опухолью LLC повышало антипролиферативную активность ЛХС-1269. Применение НТЛР приводило к росту числа клеток крови мышей — лейкоцитов, лимфоцитов и фагоцитов, ответственных за противоопухолевый иммунитет.

Химиотерапевтическое воздействие комбинации ЛХС-1269 и НТЛР показало выраженный устойчивый противоопухолевый ответ в отношении LLC в системе периферической крови мышей на фоне временного увеличения числа нейтрофилов и моноцитов на 12-е сутки развития опухоли. Очевидно, тестируемые соединения стимулировали пролиферацию нейтрофилов и моноцитов определенных фенотипов с противоопухолевой активностью на более раннем этапе развития LLC. Преимущество комбинированного применения ЛХС-1269 и НТЛР подтверждается данными по критерию торможения опухолевого роста LLC и длительности противоопухолевого эффекта в те же сроки наблюдения за животными.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках государственного задания по теме «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований» (№ АААА-А20-120031190013-9, 2020–2022 гг.) и проекта междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» (№ 23-Ш06-08).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, при-

нятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (заключение № 03П-21/5-24).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heidkamp J., Scholte M., Rosman C., Manohar S., Fütterer J. J., and Rovers M. M. Novel imaging techniques for intraoperative margin assessment in surgical oncology: A systematic review. *Int. J. Cancer*, **149** (3), 635–645 (2021). DOI: 10.1002/ijc.33570
- Cha J. H., Chan L. C., Song M. S., and Hung M. C. New approaches on cancer immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10** (8), a036863 (2020). DOI: 10.1101/cshperspect.a036863
- Анисимов М. Н. и Гудимчук Н. Б. «Зоопарк» ингибиторов динамики микротрубочек. *Прупода*, № 8, 3–12 (2020). DOI: 10.7868/S0032874X20080013
- Dona Lemus O. M., Cao M., Cai B., Cummings M., and Zheng D. Adaptive radiotherapy: next-generation radiotherapy. *Cancers*, **16** (6), 1206 (2024). DOI: 10.3390/cancers16061206
- Karati D. and Kumar D. A Comprehensive review on targeted cancer therapy: new face of treatment approach. *Curr. Pharm. Des.*, **29** (41), 3282–3294 (2023). DOI: 10.2174/0113816128272203231121034814
- Siegel R. L., Giaquinto A. N., and Jemal A. Cancer statistics, 2024 [erratum in *CA Cancer J. Clin.*, **74** (2), 203 (2024)]. *CA Cancer J. Clin.*, **74** (1), 12–49 (2024). DOI: 10.3322/caac.21820
- Yu Y., Shen M., Song Q., and Xie J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review. *Carbohydr. Polym.*, **183**, 91–101 (2018). DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009
- Generalov E. A. Antimetastatic and tumor growth inhibition activity of polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. *ARC J. Cancer Sci.*, **1** (1), 5–10 (2015). DOI: 10.20431/2455-6009.0101002
- Du H., Jin X., Jin S., Zhang D., Chen Q., Jin X., Wang C., Qian G., and Ding H. Anti-leukemia activity of polysaccharide from *sargassum fusiforme* via the pi3k/akt/bad pathway *in vivo* and *in vitro*. *Mar. Drugs*, **21** (5), 289 (2023). DOI: 10.3390/md21050289.
- Li M., Liu Y., Zhang H., Liu Y., Wang W., You S., Hu X., Song M., Wu R., and Wu J. Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from *Polygonatum sibiricum* on HepG2 cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Front. Nutr.*, **9**, 1054565 (2022). DOI: 10.3389/fnut.2022.938290
- Yue L., Cui H., Li C., Lin Y., Sun Y., Niu Y., Wen X., and Liu J. A polysaccharide from *Agaricus blazei* attenuates tumor cell adhesion via inhibiting E-selectin expression. *Carb. Pol.*, **88** (4), 1326–1333 (2012). DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.02.015
- Cao R., Jin W., Shan Y., Wang J., Liu G., Kuang S., and Sun C. Marine bacterial polysaccharide EPS11 inhibits cancer cell growth via blocking cell adhesion and stimulating anoikis. *Mar. Drugs*, **16** (3), 85 (2018). DOI: 10.3390/md16030085.
- Ping Z., Xu H., Liu T., Huang J., Meng Y., Xu X., Li W., and Zhang L. Anti-hepatoma activity of the stiff branched β -d-glucan and effects of molecular weight. *J. Mater. Chem. B*, **4** (26), 4565–4573 (2016). DOI: 10.1039/c6tb01299j.
- Jiang Z., Chi J., Li H., Wang Y., Liu W., and Han B. Effect of chitosan oligosaccharide-conjugated selenium on improving immune function and blocking gastric cancer growth. *Eur. J. Pharmacol.*, **891**, 173673 (2020). DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173673.
- Guo R., Chen M., Ding Y., Yang P., Wang M., Zhang H., He Y., and Ma H. Polysaccharides as potential anti-tumor biomacromolecules – a review. *Front. Nutr.*, **9**, 838179 (2022). DOI: 10.3389/fnut.2022.838179
- Li W., Song K., Wang S., Zhang C., Zhuang M., Wang Y., and Liu T. Anti-tumor potential of astragalus polysaccharides on breast cancer cell line mediated by macrophage activation. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **98**, 685–695 (2019). DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.025.
- Bao X., Yuan H., Wang C., Liu J., and Lan M. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydr. Polym.*, **98**, 1236–1243 (2013). DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.07.018
- Liu Y., Zhang L., Zhu X., Wang Y., Liu W., and Gong W. Polysaccharide *Agaricus blazei* Murill stimulates myeloid derived suppressor cell differentiation from M2 to M1 type, which mediates inhibition of tumour immune-evasion via the toll-like receptor 2 pathway. *Immunology*, **146** (3), 379–391 (2015). DOI: 10.1111/imm.12508.
- Khan T., Date A., Chawda H., and Patel K. Polysaccharides as potential anticancer agents – a review of their progress. *Carbohydr. Polym.*, **210**, 412–428 (2019). DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.064
- Generalov E. A. Study of the structure and immunoenhancing activity of glucan ADVA. *Moscow Univ. Phys.*, **68**, 470–477 (2013). DOI: 10.3103/S0027134913060040
- Pang G., Wang F., and Zhang L. W. Dose matters: direct killing or immunoregulatory effects of natural polysaccharides in cancer treatment. *Carbohydr. Polym.*, **195**, 243–256 (2018). DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.100.
- Gao X. and Homayoonfal M. Exploring the anti-cancer potential of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLPs) and their versatile role in enhancing drug delivery systems: a multifaceted approach to combat cancer. *Cancer Cell Int.*, **23** (1), 324 (2023). DOI: 10.1186/s12935-023-03146-8.
- Safonova E. A., Lopatina K. A., Razina T. G., Zueva E. P., Fedorova E. P., Gur'ev A. M., and Belo-

- usov M. V. Modification of the myelotoxic and antitumor effects of polychemotherapy by polysaccharides from *Tussilago farfara* L. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166** (2), 197–200 (2016). DOI: 10.1007/s10517-018-4313-5
24. Zenkov R. G., Ektova L. V., Vlasova O. A., Belitskiy G. A., Yakubovskaya M. G., and Kirsanov K. I. Indolo[2,3-*a*]carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy. *Chem. Heterocyc. Comp.*, **56** (6), 644–658 (2020). DOI: 10.1007/s10593-020-02714-4
 25. Kozin D. A., Shprakh Z. S., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Avertseva I. N., and Rodionova G. M. Indolo[2,3-*a*]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation. *Drug Dev. Registr.*, **9** (4), 15–20 (2020). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135
 26. Kolpaksidi A. P., Dmitrieva M. V., Yarosh I. V., and Krasnyuk I. I. Antitumor drugs based on indolocarbazol derivatives. *Pharmacy & Pharmacol.*, **9** (4), 252–265 (2021). DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265
 27. Éktova, L. V., Goryunova, O. V., Eremina, V. A., Tikhonova N. I., and Medvedeva L. A. An improved method for the synthesis of the of indole[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole-5,6-dione N-glycosides and their cytotoxic activity. *Pharm. Chem. J.*, **53**, 604–609 (2019). DOI: 10.1007/s11094-019-02046-4
 28. Николаева Л. Л., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Оборотов А. В., Игнатъева Е. В., Шпрах З. С., Кульбачевская Н. Ю. и Коняева О. И. Разработка состава и технологии получения модели инъекционной формы производного индолокарбазола. *Хим.-фармацевт. журн.*, **57** (6), 42–46 (2023). DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-6-42-46
 29. Vartanian A., Golubeva I., and Shprakh Z. Is vasculogenic mimicry a hallmark of an aggressive tumor? In: *Horiz. Cancer Res.* (Nova Science Publishers, Inc., 2017), v. 65, pp. 13–33.
 30. Vartanian A., Misyurin V. A., Baryshnikova M. A., and Shprakh Z. Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Melanoma Res.*, **27** (1), 8–16 (2017). DOI: 10.1097/CMR.0000000000000308
 31. Generalov E. A. Water-soluble polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L.: radioprotective, colony-stimulation and immunomodulation activities. *Biophysics*, **60** (1), 73–79 (2015).
 32. Generalov E. and Yakovenko L. Receptor basis of biological activity of polysaccharides. *Biophys. Rev.*, **15**, 1209–1222 (2023). DOI: 10.1007/s12551-023-01102-4
 33. Generalov E. A. and Afremova A. I. The Molecular mechanism of the action of *Helianthus tuberosus* L. polysaccharide. *Biophysics*, **61**, 558–564 (2016). DOI: 10.1134/S0006350916040096
 34. Kalitin N. N., Ektova L. V., Kostritsa N. S., Sivirina A. S., Kostarev A. V., Smirnova G. B., Borisova Y. A., Golubeva I. S., Ermolaeva E. V., Vergun M. A., Babaeva M. A., Lushnikova A. A., and Karamysheva A. F. A novel glycosylated indolocarbazole derivative LCS1269 effectively inhibits growth of human cancer cells in vitro and in vivo through driving of both apoptosis and senescence by inducing of DNA damage and modulating of AKT/mTOR/S6K and ERK pathways. *Chem. Biol. Interact.*, **364**, 110056 (2022). DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110056
 35. Голубева И. С., Яворская Н. П., Эктова Л. В., Дмитриева М. В., Борисова Л. М., Еремина В. А., Тихонова Н. И. и Пугачева Р. Б. Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индоло[2,3-*a*]карбазолов с углеводным остатком ксилозой. *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 86–93 (2020). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93
 36. Zenkov R. G., Vlasova O. A., Maksimova V. P., Fetisov T. I., Karpechenko N. Y., Ektova L. V., Eremina V. A., Popova V. G., Usalka O. G., Lesovaya E. A., Belitskiy G. A., Yakubovskaya M. G., and Kirsanov K. I. Molecular mechanisms of anticancer activity of N-glycosides of indolocarbazoles LCS-1208 and LCS-1269. *Molecules*, **26** (23), 7329 (2021). DOI: 10.3390/molecules26237329
 37. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. | FAOLEX n.d. URL: <https://www.fao.org/faolex/results/details/ru/c/LEX-FAOC098296/> (accessed: 30.08.2023).
 38. Трещалина Е. М., Смирнова Г. Б. и Андропова Н. В. *Коллекция опухолевых штаммов животных для экспериментальной химиотерапии злокачественных опухолей* (Практическая медицина, М., 2022).
 39. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андропова Н. В. и Гарин А. М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 640–657.
 40. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М. и Шахов В. П. *Методы культуры ткани в гематологии* (Изд-во Томского университета, Томск, 1992).
 41. *Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США*. Под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина, А. Голдина и А. Кляйна (Медицина, М., 1980).
 42. Крицкая К. А., Петренко В. С., Ларюшкин Д. П., Наумов А. А. и Поцелуева М. М. Действие различных концентраций хелатора железа (дефероксамина), на клетки асцитной карциномы ЭРЛИХА *in vitro*. В сб. *Матер. 22-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»* (Синхробук, Пушино, 2018), с. 352. EDN: URYPPS

Influence of Polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. on Antiproliferative Activity of N-Glycoside Indolo[2,3-a]carbazole Derivative LCS-1269

M.P. Kiseleva*, I.S. Golubeva*, V.P. Deryagina*, A.V. Lantsova*, L.V. Ektova*,
E.A. Kornushenkov*, L.M. Borisova*, and E.A. Generalov**

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
Kashirskoye Shosse 24, Moscow, 115522 Russia

**Department of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The Lewis model of epidermoid carcinoma that developed in the lungs of F1(C₅₇Bl/6 × DBA/2) hybrid mice has been used while investigating antitumor activity of the N-glycoside derivative indolo[2,3-a]carbazole (LCS-1269) with a polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. as an adjuvant agent. The antitumor effect of LCS-1269 together with the polysaccharide was evaluated by the inhibition of tumor growth in treated animals in comparison to the control group. As a result, it was found that combination of LCS-1269 with the polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. provided more pronounced therapeutic and longer-lasting effect than monotherapy showing a 53–64% decrease in growth of Lewis lung carcinoma for up to a 28-day observation period. Polysaccharide supplementation led to an increase in the number of blood cells - leukocytes, lymphocytes and phagocytes responsible for antitumor immunity. The chemotherapy in combination with LCS-1269 and polysaccharide had a pronounced sustained antitumor effect on Lewis lung carcinoma in the peripheral blood system of mice in presence of a temporarily increased level of neutrophils and monocytes by the 12th day of tumor development. Apparently, the tested compounds stimulated proliferation of neutrophils and monocytes of certain phenotypes with antitumor activity at an earlier stage of Lewis lung carcinoma development.

Keywords: polysaccharide from Helianthus tuberosus L., indolocarbazole derivative LCS-1269, Lewis epidermoid lung carcinoma, antitumor activity