

На правах рукописи



Кнауэр Надежда Юрьевна

**ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ
СВОЙСТВА КАТИОННЫХ ДЕНДРИТНЫХ МОЛЕКУЛ И ИХ
КОМПЛЕКСОВ С МИКРОРНК**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,

Козлов Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

Козлов Иван Генрихович – доктор медицинских наук, профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Института последиplomного образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации

Карпенко Лариса Ивановна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный Научный Центр Вирусологии и Биотехнологии “Вектор”» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ГНЦ “Институт иммунологии” ФМБА России).

Защита состоится «___» _____ 2023 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01) в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Облеухова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Иммунотерапия опухолевых заболеваний – это одно из самых активно развивающихся направлений в современной медицине, кардинально изменившее подходы в онкологии.

Известно, что опухолевые клетки активно используют механизмы, позволяющие уйти из-под надзора иммунной системы, связанные с нарушениями в презентации антигенов или снижением экспрессии опухоль-ассоциированных антигенов на поверхности опухолевой клетки, с активацией негативных регуляторных путей в иммунокомпетентных клетках или с привлечением популяций клеток с иммуносупрессивными свойствами [Khong и др, 2002; Rabinovich и др, 2007]. Среди молекул, связанных с уходом опухоли из-под надзора иммунной системы, стоит выделить PD-L1, лиганд рецептора PD-1, обнаруженного на поверхности ряда иммунокомпетентных клеток, а также экспрессируемые опухолевыми стволовыми клетками негативный чекпойнт-регулятор TIM-3 и Ig-подобный белок CD47, выступающий как сигнал “do not eat me” по отношению к макрофагам, нейтрофилам и дендритным клеткам. Эти маркеры связывают с ухудшением прогноза у пациентов.

Актуальным становится поиск инструмента, позволяющего добиться как элиминации опухоли, так и предотвращения ее прогрессии и метастазирования, путем одновременного воздействия на несколько ключевых этапов метаболизма опухолевых клеток и их иммунного микроокружения. С этой точки зрения перспективным представляется использование микроРНК – разновидности малых некодирующих РНК, представляющих собой короткие одноцепочечные олигонуклеотиды с регуляторными свойствами [Garzon и др, 2010; Gulyaeva и др, 2016; Hirschberger и др, 2018; Ji и др, 2017; Labatut и др, 2018].

МикроРНК, имеющие своими мишенями наиболее важные этапы клеточного цикла, могут быть перспективным инструментом для задач противоопухолевой терапии. При этом принципиально можно выделить разные подходы:

- Использование микроРНК, активирующих иммунный ответ: привлекательным кандидатом на эту роль является miR-155. [Pashangzadeh и др., 2021; Trotta и др., 2012].
- Использование микроРНК с противоопухолевыми свойствами или их модификаций: например, микроРНК,

подавляющей туморогенез, является микроРНК-34, [Daige и др., 2014; Li и др., 2017].

- Использование синтетических ингибиторов (amiRs) микроРНК, ассоциированных с развитием определенных видов опухолей (onco-miRs). В качестве цели для синтетических анти-микроРНК перспективно выглядит микроРНК-21 [Chan, Krichevsky, Kosik, 2005; Lawrie, 2013].

Таким образом, микроРНК можно рассматривать как многофункциональный инструмент для воздействия как на опухолевые, так и иммунокомпетентные клетки. Однако, задача доставки микроРНК значительно усложняется за счет их быстрой деградации в биологических средах. В связи с этим разработан ряд подходов, предлагающих использование носителей вирусного и невирусного происхождения для транспорта микроРНК к целевым клеткам и тканям [Dasgupta и др, 2021; Zhang и др, 2013].

Одним из них стало использование катионных дендримеров – наноразмерных полимеров древообразной структуры, несущих положительные заряды на поверхности. Они способны нековалентно связывать олигонуклеотиды, формируя комплексы (дендриплексы), транспортирующие нуклеиновые кислоты в клетки, что было показано в работах с доставкой микроРНК и малых интерферирующих РНК (siRNA) в модели ВИЧ-инфекции [Bermejo и др., 2007; Jiménez и др., 2010; las Cuevas de и др., 2012], проапоптотических siRNA и ДНК-плазмид в опухолевые клетки [Białkowska и др., 2021; Caminade, 2020; Krasheninina и др., 2019].

Существующие литературные данные неполно описывают особенности воздействия дендримеров и их комплексов с микроРНК на клетки иммунной системы и опухолевые клетки. В связи с этим нами была сформулирована следующая цель и задачи:

Цель: Изучить эффекты катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК (дендриплексов) на жизнеспособность и функциональную активность иммунокомпетентных и опухолевых клеток.

Задачи:

1. Оценить цитотоксичность дендримеров и дендриплексов в отношении иммунокомпетентных и опухолевых клеток;

2. Оценить способность дендриплексов проникать в иммунокомпетентные и опухолевые клетки;
3. Оценить эффекты дендримеров и дендриплексов на иммунокомпетентные клетки: изменение фенотипического состава и пролиферативной активности; относительное количество клеток, экспрессирующих маркеры CD25, HLA-DR, PD-1; секреция перфорины и гранзима В; продукция цитокинов в культуре МНК ПК.
4. Оценить влияние дендримеров и дендриплексов на показатели, характеризующие взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением: относительное количество клеток, экспрессирующих PD-L1, TIM-3, CD47; продукция IL-10.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Катионные дендримеры обеспечивают эффективную доставку терапевтических олигонуклеотидов (микроРНК) в иммунокомпетентные и опухолевые клетки.
2. Комплексы катионных дендримеров с иммуномодулирующими микроРНК не оказывают цитотоксического эффекта на иммунокомпетентные клетки и обладают иммуностимулирующим эффектом.
3. Катионные дендримеры и их комплексы с микроРНК, имеющими противоопухолевую активность, стимулируют гибель опухолевых клеток.
4. Катионные дендримеры изменяют экспрессию PD-L1, TIM-3, CD47 на опухолевых клетках.

Научная новизна

Впервые исследован эффект катионных дендримеров 3 поколения и их комплексов с иммуномодулирующими микроРНК на жизнеспособность МНК ПК условно здоровых доноров, произведена оценка IC50 исследуемых дендримеров. Впервые было проведено исследование интернализации комплексов катионных дендримеров 3 поколения с микроРНК в иммунокомпетентные и опухолевые клетки.

Впервые был исследован эффект дендриплексов на основе катионных дендримеров и микроРНК с иммуномодулирующими свойствами на относительное количество клеток различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток и их пролиферативной активности; экспрессию поверхностных маркеров CD25, HLA-DR, PD-1; секрецию перфорины и гранзима В; продукцию цитокинов в культуре МНК ПК.

Впервые было проведено исследование цитотоксической активности дендримеров и их комплексов с микроРНК, обладающими противоопухолевыми свойствами (miR-34, amiR-21), в отношении различных опухолевых культур. Впервые были получены данные о влиянии дендримеров и их комплексов на относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры, характеризующих взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением.

Теоретическая и практическая значимость:

Данное исследование представляет собой первое доклиническое исследование биологических свойств катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими и противоопухолевыми микроРНК. Полученные результаты могут использоваться в дальнейшем для создания терапевтических конструкций для задач лекарственной доставки в иммунотерапии, онкологии.

Степень достоверности, апробация результатов и личное участие автора

Достоверность полученных результатов подтверждается логично выстроенным алгоритмом работы, достаточной выборкой исследования, использованием современных иммунологических и молекулярно-биологических методов и адекватных методов статистической обработки. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Материалы исследования доложены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов НИИФКИ, 2022-2023 гг; конференции участников программы научно-технических обменов Консорциума COST Nano2Clinic “From the bench to the bedside”, 2022; Конгрессах Европейского общества медицинской онкологии ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress 2022 и 2023; Конгрессе Европейской гематологической ассоциации EHA Congress 2022; Конгрессе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии EAACI Congress 2022; Конференции Консорциума COST Nano2Clinic, 2020; Конгрессе Европейской гематологической ассоциации EHA Congress 2020; Конгрессе Европейского общества медицинской онкологии ESMO Immuno-oncology 2020.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ в журналах, индексирующихся в базе Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ.

Структура и объем диссертации

Материал диссертации изложен на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирован 39 рисунками и 15 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель содержит 322 цитируемых источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являлись катионные дендримеры 3 поколения (**Рисунок 1**) и их комплексы с микроРНК; синтетические аналоги микроРНК miR-155, miR-34; синтетические ингибиторы микроРНК miR-155 (amiR-155), miR-21 (amiR-21); мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) условно здоровых доноров, а также клетки ряда линий: клетки опухолевой линии Jurkat (острая Т-лимфобластная лейкемия человека); клетки линий опухолевых стволовых клеток глиобластомы человека BTSC233, JHH520, NCH644, GBM1; клетки опухолевой линии глиобластомы человека U87; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека iPSCs.

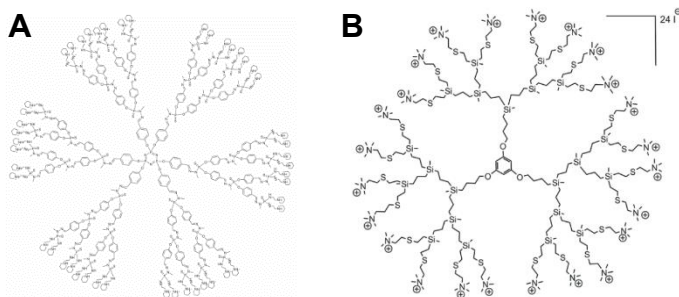


Рисунок 1. Структуры катионного фосфорного дендримера 3 поколения AE2G3 (A) и катионного карбосиланового дендримера 3 поколения BDEF33 (B)

Критериями исключения для доноров были: беременность или период лактации, наличие острого инфекционного заболевания, введение любых вакцин в течение 3 месяцев перед исследованием, а также наличие тяжелых сопутствующих патологий. Набор участников осуществлялся после подписания добровольного информированного согласия. Характеристика донорской группы приведена в **Таблице 1**, данные указаны согласно экспериментам, для которых проводился набор подгрупп.

Таблица 1. Распределение демографических характеристик доноров МНК ПК по этапам экспериментальной работы

	N	Соотношение М:Ж	Возраст (Mean ± SD)
Жизнеспособность клеток			
<i>AE2G3</i>	6	3:3	25.7 ± 1.6
<i>AE2G3/miR</i>	5	3:2	25.0 ± 0.0
<i>BDEF33</i>	5	1:4	37.2 ± 13.0
<i>BDEF33/miR</i>	8	3:5	25.3 ± 1.7
Апоптоз	6	2:4	29.0 ± 7.5
Активность ЛДГ	5	2:3	41.6 ± 21.5
Интернализация	6	3:3	31.7 ± 9.9
Клеточная пролиферация и фенотипический состав	6	2:4	38.5 ± 20.9
Продукция перфорина и гранзима	6	2:4	27.5 ± 7.0
Продукция цитокинов	5	1:4	41.2 ± 21.9

Приготовление рабочих растворов дендримеров и их комплексов с микроРНК (дендриплексов)

Для приготовления дендриплексов растворы олигонуклеотидов смешивали в соответствии с рассчитанным ранее оптимальным зарядовым соотношением 10 [Ihnatsyeyu-Kachan и др., 2017]. Комплексы инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и использовали для последующих работ. Исследуемые клетки культивировались с дендримерами и их комплексами в течение 4 ч (оценка интернализации) или 72 ч (прочие эксперименты).

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) условно здоровых доноров

Из кубитальной вены условно здоровых доноров производили забор 10-20 мл венозной крови в стерильных условиях в вакуумные пробирки с гепарином. Выделение МНК осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина.

Анализ экспрессии поверхностных клеточных маркеров методом проточной цитофлуориметрии

Фенотипирование исследуемых клеток проводилось методом многоцветной проточной цитометрии. Исследуемые клетки после культивирования окрашивали конъюгированными с флуорохромами человеческими моноклональными антителами к поверхностным маркерам: Annexin V-Pacific Blue, CD127-PerCP/Cy 5.5, CD14-PE/Cy7, CD16-PerCP, CD19-APC, CD25-APC, CD25-PE, CD3-PerCP, CD3-PE/Cy7, CD45-APC/Cy7, CD47-APC, CD4-APC, CD4-APC/Cy7, CD56-PE/Cy7, CD8-PE/Cy7, granzyme B-PE, HLA-DR-APC/Cy7, PD-1-FITC, PD-L1-PE, perforin-FITC, TIM-3-FITC (Biolegend, США).

Окрашивание проводили комбинацией антител согласно протоколу, рекомендованному производителем. Фенотипирование клеточных популяций и исследование пролиферативной активности проводили на цитофлуориметрах FACS Canto II, BD, CyAn Daco, Beckman Coulter с последующим анализом (ПО FACS Diva, BD; Summit, Kaluza, Beckman Coulter).

Анализ пролиферативной активности клеток производился методом подсчета относительного числа пролиферирующих клеток, окрашенных CFSE, по уровню их флуоресценции, и не включал в себя пик неделящихся клеток.

Оценка жизнеспособности клеток и индукции апоптоза

Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью колориметрических методов с использованием тетразолиевых красителей (MTT, WST). Полученные значения измерений оптического поглощения использовали для вычисления относительного показателя оптического поглощения, характеризующего жизнеспособность клеток по отношению к необработанному контролю.

Оценка параметров индукции апоптоза производилась методом цитофлуориметрического анализа клеток, окрашенных пропидия

йодидом и моноклональными антителами к аннексину V Annexin V-FITC.

Оценка активности ЛДГ

Колориметрический анализ активности ЛДГ проводилась согласно рекомендациям производителя тестового набора LDH Assay Kit Colorimetric через 10 и 20 мин после добавления тестового реагента.

Интернализация комплексов, содержащих микроРНК

Оценка проникновения клеток проводилось путем детекции флуоресцентного сигнала в клетках после обработки дендриплексами с помощью методов проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии.

Оценка секреции цитокинов

Для оценки уровня продукции цитокинов после культивирования клеток с исследуемыми молекулами и их комплексами отбирались кондиционные среды, концентрация цитокинов (IL-10, IL-4, TNF α , и IFN γ) определялась методом ИФА согласно рекомендациям производителя (Вектор-БЕСТ, Новосибирск, Россия; Biolegend, США). Измеренные значения оптического поглощения выражали как долю (%) от значений, полученных для необработанного контроля (NTC).

Статистический анализ и визуализация данных

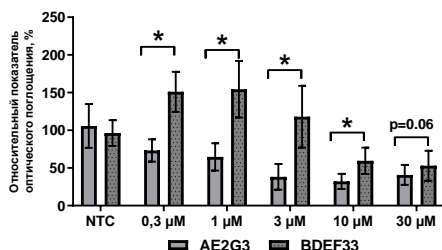
Статистический анализ данных проводили с использованием программ Statistica 8.0 (StatSoft), GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) методами непараметрической статистики. Для оценки значимости различий между независимыми группами использовали критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Иммуномодулирующие свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК

Оценка собственного токсического эффекта дендримеров на МНК ПК

Для обоих исследуемых дендримеров, AE2G3 и BDEF33, наблюдался дозозависимый токсический эффект (см. **Рисунок 2**). Для BDEF33 было выявлено возрастание показателя относительной жизнеспособности обрабатываемых клеток при использовании дендримера в низких концентрациях – 0,3 мкМ ($p=0.009$) и 1 мкМ ($p=0.021$) по сравнению с NTC. Одним из вероятных объяснений этому может быть тот факт, что при обработке дендримером в низких концентрациях возрастает внутриклеточная окислительная активность, которая детектируется методом WST/MTT как возрастание показателя оптической плотности. При повышении концентрации дендримера показатель резко падает в силу наступления клеточной гибели. Кривая изменения жизнеспособности клеток для AE2G3 при этом выглядит более пологой. AE2G3 демонстрировал более высокую токсичность, нежели BDEF33, при использовании его в низких и средних концентрациях – 0,3 мкМ ($p=0.005$), 1 мкМ ($p=0.0076$), 3 мкМ ($p=0.007$). Эти данные согласуются также с расчетами IC50 для обоих дендримеров: IC50 AE2G3 оказалась ниже ($3,02 \pm 1,12$ мкМ), чем IC50 BDEF33 (>30 мкМ).



*Рисунок 2. Оценка собственных токсических эффектов AE2G3 и BDEF33 на жизнеспособность МНК ПК условно здоровых доноров. Знак * обозначает достоверные различия между группами ($p < 0.05$).*

Оценка параметров интернализации микроРНК в МНК ПК

Дендримеры могут эффективно транспортировать микроРНК в МНК ПК условно здоровых доноров ($p=0.006$ по сравнению с NTC для AE2G3/miR; $p=0.0013$ для BDEF33/miR; $p=0.006$ по сравнению

со свободной miR для AE2G3/miR, $p=0.0025$ по сравнению со свободной miR для BDEF33/miR), при этом BDEF33 транспортировал микроРНК внутрь клеток с более высокой эффективностью ($p=0.031$) (см **Рисунок 3**). Аналогичные результаты были получены и при проведении флуоресцентной микроскопии.

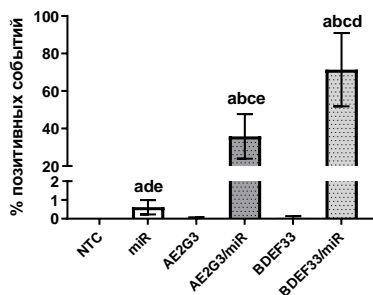


Рисунок 3. Интернализация комплексов дендримеров с FAM-меченой микроРНК-155 в МНК ПК условно здоровых доноров (4 ч). Различия при $p < 0.05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – со свободным дендримером; “c” – со свободной miR; “d” – с AE2G3/miR; “e” – с BDEF33/miR

Оценка цитотоксических эффектов дендриплексов на МПК ПК

При оценке жизнеспособности МНК ПК после 72 ч культивирования с дендриплексами нами не было обнаружено значимых токсических эффектов при внесении дендриплексов на основе как AE2G3, так и BDEF33. Свободные олигонуклеотиды также не снижали жизнеспособности клеток. Сходные результаты были продемонстрированы и при оценке активности ЛДГ в культуральной среде МНК ПК условно здоровых доноров через 10 и 20 минут после внесения дендриплексов или их свободных компонентов – активность ЛДГ значимо не возрастала, что можно считать подтверждением отсутствия выраженной цитотоксичности комплексов. Более того, нами не было обнаружено значимой индукции апоптоза $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов после 72 часов культивирования.

Оценка влияния дендриплексов на субпопуляционный состав в культуре МНК ПК

Нами было выявлено лишь небольшое повышение процентного содержания $CD3^+$ клеток после обработки AE2G3 и его комплексами AE2G3/miR-155 и AE2G3/amiR-155 по сравнению с NTC ($p=0.068$ для всех групп). Так же мы не обнаружили изменений в пролиферативной активности $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток.

В то же время внесение дендримеров способствовало снижению доли Т-регуляторных клеток по сравнению с NTC – как в культурах

с обработкой BDEF33 ($p=0.043$), так и AE2G3 (тенденция, $p=0.059$). Схожей активностью обладали и комплексы BDEF33 – BDEF33/miR-155 ($p=0.028$), BDEF33/amiR-155 (тенденция, $p=0.063$). Для комплексов AE2G3 это обнаруживалось лишь для дендриплекса AE2G3/amiR-155 в качестве тенденции ($p=0.063$). Мы наблюдали небольшое увеличение числа CD14⁺ клеток в культуре после обработки как AE2G3 ($p=0.031$), так и BDEF33 (в виде тенденции, $p=0.062$). Этот же эффект проявлялся после использования комплексов AE2G3/miR-155 ($p=0.03$) и AE2G3/amiR-155 ($p=0.031$). Количество CD45⁺CD19⁺ В-лимфоцитов несколько снижалось после обработки свободными дендримерами AE2G3 (тенденция, $p=0.06$) и BDEF33 ($p=0.031$), аналогичными эффектами обладали дендриплексы ($p=0.031$ для AE2G3/miR-155, AE2G3/amiR-155, BDEF33/amiR-155 и тенденция, $p=0.063$ для BDEF33/miR-155).

Оценка влияния дендриплексов на экспрессию поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток

Мы не обнаружили изменений доли CD25-позитивных клеток ни среди CD4⁺, ни среди CD8⁺ Т-лимфоцитов ни в одной из групп. В то же время отмечалось увеличение относительного количества CD4⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов при обработке комплексами AE2G3/miR-155 ($p=0.0313$).

Для CD8⁺ Т-лимфоцитов отмечалось достоверное повышение доли HLA-DR⁺ клеток при использовании комплекса AE2G3/miR-155 и AE2G3/amiR-155 по сравнению с контролем ($p=0.03$ для обоих комплексов) и свободным дендримером AE2G3 ($p=0.002$).

Ни свободные дендримеры, ни свободные микроРНК не изменяли значимо долю PD-1-позитивных клеток среди CD4⁺ Т-лимфоцитов (см **Рисунок 4**). В то же время использование дендриплексов увеличивало этот показатель по сравнению с NTC ($p=0.046$ для BDEF33/miR-155 и $p=0.0025$ для обоих дендриплексов с AE2G3). Эффекты дендримеров и соответствующих им комплексов значимо не различались.

Напротив, мы наблюдали снижение относительного количества CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих PD-1, по сравнению с контролем: данный эффект наблюдался при внесении в культуры комплекса BDEF33/amiR-155 ($p=0.016$).

CD19⁺ В-лимфоциты оказались нечувствительны к воздействию свободных микроРНК, однако отвечали на внесение дендримеров и

их комплексов: мы выявили повышение экспрессии PD-1 при использовании как AE2G3-конструкций ($p=0.043$ для свободного AE2G3 и 0.03 для обоих дендриплексов), так и группы BDEF33 ($p=0.31$ для свободного BDEF33 и BDEF33/miR-155, тенденция, $p=0.06$ для BDEF33/amiR-155).

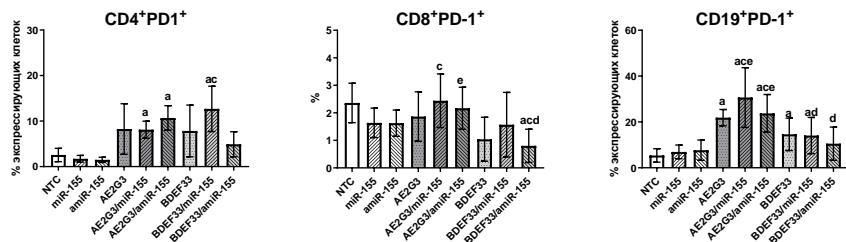


Рисунок 4. Оценка доли PD-1-позитивных T- и B-лимфоцитов после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов, свободных дендримеров и свободных микроРНК (72 ч). Различия ($p < 0.05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – со свободным дендримером; “c” – со свободной микроРНК; “d” – с AE2G3-содержащим дендриплексом; “e” – сBDEF33-содержащим дендриплексом.

При оценке количества клеток, экспрессирующих перфорин и гранзим В, нами не было выявлено достоверных изменений ни в одной из исследуемых групп клеток ($CD8^+$ Т-лимфоциты, $CD16^+CD56^+$ NK-клетки).

Продукция цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-10, IL-4) в культуре МНК ПК

Мы также не выявили значимых изменений продукции TNF α и IFN γ в исследуемых группах, секреция IL-10 незначительно снижалась после культивирования клеток с BDEF33 ($p=0.0313$) и свободной miR155 ($p=0.0313$). В то же время нами наблюдалось повышение продукции IL-4 при использовании AE2G3 и его комплексов ($p=0.007$ для свободного AE2G3; $p=0.008$ для AE2G3/miR-155; $p=0.005$ для AE2G3/amiR-155; $p=0.005$ для AE2G3/NC), BDEF33 и его комплексов ($p=0.007$ для свободного BDEF33, $p=0.027$ для BDEF33/miR-155; $p=0.0047$ для BDEF33/amiR-155; $p=0.0027$ для BDEF33/NC) по сравнению с NTC.

2. Противоопухолевые свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК

Оценка влияния дендримеров на жизнеспособность опухолевых клеток

При оценке цитотоксичности свободных дендримеров для обеих исследуемых молекул наблюдался дозозависимый токсический эффект, проявлявшийся уже в области относительно низких концентраций – как в модели лейкемии, так и в моделях глиобластомы (см **Ошибка! Источник ссылки не найден.**). При этом интересно, что при использовании АЕ2G3 в концентрации 100 мкМ отмечалось увеличение параметров жизнеспособности. Это может объясняться тем, что в высокой концентрации дендример АЕ2G3 активно формирует супрамолекулярные ассоциаты с белками сыворотки, что изменяет параметры захвата комплексов опухолевыми клетками (в ряде экспериментов формирование агрегатов в лунке при использовании высоких концентраций АЕ2G3 наблюдалось невооруженным глазом), возможность таких эффектов ранее также описывались в литературе [Maszewska и др., 2003].

В **Таблица 2** приведены значения IC₅₀ исследуемых веществ для клеток линии Jurkat и МНК ПК условно здоровых доноров в качестве контроля неопухолевых клеток.

Таблица 2. Показатели IC₅₀ (мкМ) свободных дендримеров и доксорубицина для клеток линии Jurkat и МНК ПК условно здоровых доноров.

	BDEF33	AE2G3	Dox
Jurkat	2.08 ± 0.7	6.06 ± 4.5	0.009 ± 0.005
PBMCs	42.87 ± 26.18	3.02 ± 1.12	0.23 ± 0.19

В отношении линий глиобластомы было выявлено несколько интересных закономерностей. Было показано, что исследуемые клеточные линии проявляют большую чувствительность к исследуемым дендримерам, чем к темозоломиду, классическому препарату, используемому в химиотерапии глиобластомы. Данный эффект проявляется уже на средних концентрациях (10 мкМ). Кроме того, культуры опухолевых стволовых клеток глиобластомы оказывались более чувствительными к исследуемым дендримерам по сравнению с клетками линии U87, что представляет особый интерес в свете информации о роли опухолевых стволовых клеток в обеспечении резистентности опухоли к терапии и ее метастазированию.

В **Таблица 3** приведены значения IC50 исследуемых веществ для клеток линий глиобластомы и iPSCs в качестве контроля неопухолевых клеток.

Таблица 3. Показатели IC50 (мкМ) свободных дендримеров и темозоломида для клеток линий глиобластомы и iPSCs.

	BDEF33	AE2G3	TMZ*
BTSC233	3.47 ± 1.62	2.99 ± 2.14	10
JHH520	2.1 ± 0.78	1.75 ± 1.67	10
NCH644	2.64 ± 1.03	0.32 ± 0.27	110
GBM1	1.45 ± 0.48	2.99 ± 1.22	5
U87	1.67 ± 0.74	9.24 ± 3.83	
iPS cells	6.08 ± 4.46	3.51 ± 1.82	

* - по [Vargas-Toscano и др., 2020]

При исследовании параметров индукции апоптоза опухолевых клеток после культивирования со свободными дендримерами мы наблюдали различную эффективность исследуемых молекул в различных культурах. Мы не выявили значимых изменений в параметрах апоптоза клеток линии лейкемии Jurkat после обработки дендримерами. Несколько отличался эффект дендримеров: после культивирования с BDEF33 количество живых клеток превышало таковое после культивирования с AE2G3 ($p=0.046$). Отмечалось увеличение числа раннеапоптотических клеток после использования AE2G3 по сравнению с необработанным контролем ($p=0.05$). В отношении клеточных линий глиобластомы ситуация была иной – опухолевые клетки были чувствительны к индукции апоптоза свободными дендримерами: наблюдалось снижение количества живых клеток, возрастание субпопуляций раннеапоптотических и позднеапоптотических/некротических клеток по сравнению с контролем ($p=0.05$). При этом оба исследуемых дендримера проявляли сопоставимую активность. В данных экспериментах в целом воспроизводился эффект, наблюдаемый в предыдущих исследованиях жизнеспособности клеток – дендримеры обладают более высоким токсическим эффектом, чем темозоломид. Исследуемые дендримеры проявляли либо сопоставимую активность в отношении опухолевых клеток, либо AE2G3 обладал несколько более высоким токсическим эффектом.

Влияние дендримеров на экспрессию поверхностных маркеров опухолевых клеток

Мы показали, что относительное количество клеток линии Jurkat, экспрессирующих PD-L1, возрастало после культивирования со свободными дендримерами ($p=0.0455$ для AE2G3; $p=0.03288$ для BDEF33), так и с доксорубицином ($p=0.0083$); концентрации исследуемых веществ составляли 3 мкМ. При этом наблюдаемый эффект был сопоставим для всех исследуемых молекул (см **Рисунок 5**).

Использование дендримеров снижало экспрессию PD-L1 на клетках линии GBM1 (тенденция, $p=0.05$), внесение AE2G3 при этом имело наиболее выраженный эффект. Схожий эффект наблюдался в культуре U87 (тенденция, $p=0.05$), хотя BDEF33 здесь обладал несколько большей активностью. В то же время экспрессия PD-L1 на клетках линии NCH644 возрастала при культивировании с AE2G3 ($p=0.01314$), BDEF33 и TMZ не проявляли столь выраженного эффекта; примечательно, что эти результаты согласуются также с описанными выше данными о более высокой чувствительности клеток линии NCH644 к AE2G3.

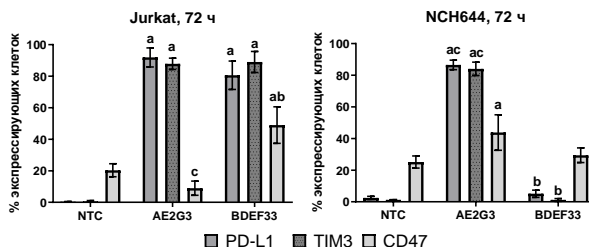


Рисунок 5. Оценка доли клеток линий Jurkat и NCH644, экспрессирующих PDL-1, TIM3, CD47 после 72 ч культивации с дендримерами; концентрация исследуемых веществ – 3 мкМ. Различия при $p < 0.05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем, “b” – с AE2G3, “c” – с BDEF33.

Отметим, что относительное количество опухолевых клеток Jurkat и NCH644, экспрессирующих TIM3 и CD47, также возрастало после культивирования с дендримерами: среди клеток линии Jurkat отмечалось повышение доли TIM3-позитивных клеток ($p=0.033$ для обоих дендримеров); клетки NCH644 реагировали на использование AE2G3 повышением количества TIM3-позитивных клеток ($p=0.03$). Паттерн изменения доли TIM3-позитивных клеток линии Jurkat сопоставим с таковым для PD-L1, что соответствует литературным

данным о сходстве функциональных изменений экспрессии данных маркеров. Клетки линии NCH644 реагировали преимущественно на внесение AE2G3, как и в случае с PD-L1.

Влияние дендримеров на секрецию IL-10 опухолевыми клетками

Нами было выявлено некоторое снижение продукции IL-10 клетками Jurkat при культивировании с молекулами BDEF33 и TMZ (тенденция, $p=0.05$), что несколько напоминало паттерн изменения секреции IL-10 после использования дендримеров в культурах МНК ПК. Клетки линии NCH644 оказались более чувствительны к дендримеру AE2G3 (тенденция, $p=0.05$).

Оценка параметров интернализации микроРНК в опухолевые клетки

При оценке параметров интернализации флюоресцентно меченной микроРНК в опухолевые клетки линии Jurkat мы выявили, что клетки достаточно эффективно поглощают микроРНК ($p=0.02$ по сравнению с контролем). РНК также интернализуется в составе комплексов с различными носителями ($p=0.005$ для всех носителей), однако эффективность интернализации была ниже таковой для свободной микроРНК; мы можем предположить, что для клеток данного типа возрастание размера частицы ухудшает захват комплекса. Отметим, что по сравнению с дендримерами, эффективность липофектамина 3000 была несколько выше (см Рисунок 6).

Рисунок 6).

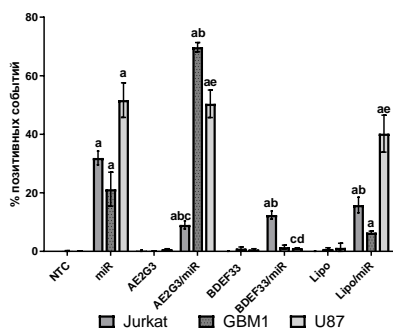


Рисунок 6. Интернализация комплексов дендримеров с FAM-меченной микроРНК в клетки линий Jurkat и NCH644 по сравнению с липофектамино 3000 (Lipo) (4 ч). Различия при $p < 0.05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (non-treated control, NTC); “b” – со свободным дендримером; “c” – со свободной miR; “d” – с AE2G3/miR; “e” – с BDEF33/miR; “f” – с Lipo/miR.

Культуры, представляющие собой модели опухолевых стволовых клеток глиобластомы, наиболее активно интернализируют комплексы микроРНК с AE2G3, при этом эффективность интернализации

превышает такую же как для свободной микроРНК, так и для комплексов с дендримером BDEF33 и стандартно используемым для трансфекции липофектаминам 3000. BDEF33 также обладает относительно низкой активностью для доставки микроРНК в опухолевые клетки U87, при этом клетки эффективно интернализуют как свободную микроРНК, так и комплексы микроРНК с AE2G3 и липофектаминам 3000. В то же время именно BDEF33 оказался наиболее эффективным носителем микроРНК для доставки в iPSCs. Таким образом, мы продемонстрировали, что дендримеры могут работать как эффективные носители микроРНК.

Оценка цитотоксического эффекта дендриплексов на опухолевые клетки

Для клеток линии Jurkat мы наблюдали низкую цитотоксичность как свободного AE2G3 (mock-контроль, 0.66 мкмоль /л), так и комплексов с микроРНК на его основе, при этом вид РНК (miR-34 или amiR-21) не имел принципиального значения (Рисунок 7). Напротив, использование свободного приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток ($p=0.0143$ по сравнению с NTC), так же как и его комплексов.

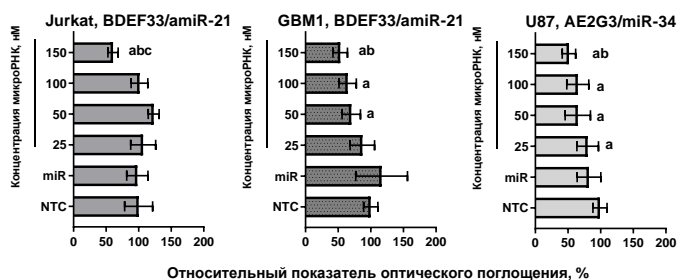


Рисунок 7. Оценка жизнеспособности опухолевых клеток после 72 ч совместного культивирования с дендриплексами. Различия при $p < 0.05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – со свободным носителем; “c” – со свободной miR.

В то же время мы все же наблюдали некоторое снижение количества живых клеток и увеличение числа раннеапоптотических клеток при анализе параметров индукции апоптоза при использовании AE2G3 и его комплексов.

В отношении клеток линии GBM1 результаты несколько отличались. Комплексы BDEF33 с miR34 и amiR-21 были лишь

незначительно более токсичны, чем комплексы AE2G3. В то же время мы наблюдали дозозависимое снижение жизнеспособности клеток при использовании комплексов, содержащих amiR-21; в большей мере этот эффект был выражен для дендримера BDEF33, что позволяет предполагать большую чувствительность опухолевых клеток к этой молекуле. Это предположение подтверждается данными анализа параметров апоптоза клеток данной линии (тенденция, $p=0.05$): BDEF33 и его комплексы снижали количество живых клеток и увеличивали численность раннеапоптотических.

Иная картина наблюдалась для клеток линии U87 – здесь большей цитотоксичностью обладали комплексы AE2G3, демонстрировавшие умеренный цитотоксический эффект, при этом профили для дендриплексов, содержащих miR34 и amiR21, были сходны. При анализе параметров индукции апоптоза наблюдалось некоторое снижение количества живых клеток и увеличение количества раннеапоптотических клеток при использовании как дендримеров, так и их комплексов (тенденция, $p=0.05$).

Оценка влияния дендриплексов на экспрессию поверхностных маркеров опухолевых клеток

При оценке доли опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1 после 72 ч культивирования с дендриплексами, мы не выявили значимых изменений этого показателя на клетках линий Jurkat, U87. В то же время мы наблюдали некоторое снижение этого показателя для клеток линии GBM1 как после использования свободных РНК (тенденция, $p=0.05$), так и после использования дендримеров и их комплексов (тенденция, $p=0.05$ для AE2G3 и его комплексов; $p=0.05$ для BDEF33 и BDEF33/miR-34; $p=0.0392$ BDEF33/amiR-21 по сравнению с NTC).

Таким образом, настоящее исследование представляет собой первое доклиническое исследование биологических свойств катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими и противоопухолевыми микроРНК. Полученные результаты могут использоваться в дальнейшем при создании терапевтических конструкций для задач иммунотерапии.

Выводы

1. Внесение исследуемых дендримеров AE2G3 и BDEF33 в средних и высоких дозах (3 мкмоль/л и более) приводило к гибели клеток в культуре МНК ПК условно здоровых доноров, данный эффект был более выражен для фосфорного дендримера AE2G3, чем для BDEF33. Это говорит о наличии собственного дозозависимого токсического эффекта свободных дендримеров в отношении иммунокомпетентных клеток.
2. Культивирование МНК ПК в присутствии комплексов катионных дендримеров с флуоресцентно меченной микроРНК amiR-155-FAM приводило к возрастанию доли FAM-позитивных клеток; эффект был более выражен для BDEF33, чем для AE2G3. Данный результат свидетельствуют о том, что катионные дендримеры способны эффективно доставлять микроРНК в иммунокомпетентные клетки, при этом BDEF33 является более эффективным транспортером, чем AE2G3.
3. Внесение комплексов катионных дендримеров AE2G3 и BDEF33 и микроРНК с иммуномодулирующими свойствами в культуру МНК ПК не приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток и не изменяло активности ЛДГ, что говорит о низкой токсичности исследуемых комплексов в отношении иммунокомпетентных клеток *in vitro*.
4. Обработка культуры МНК ПК комплексами катионных дендримеров и микроРНК с иммуномодулирующими свойствами приводит к повышению доли клеток, экспрессирующих HLA-DR, PD-1 (CD4⁺HLA-DR⁺, CD4⁺PD1⁺, CD8⁺HLA-DR⁺, CD19⁺PD1⁺), умеренному повышению продукции IL-4, что свидетельствует о возможности стимулирования иммунного ответа исследуемыми комплексами.
5. Внесение катионных дендримеров AE2G3 и BDEF33 в культуры опухолевых клеток линий лейкемии (Jurkat) и глиобластомы (BTSC233, JNH520, NCH644, GBM1, U87) приводит к гибели опухолевых клеток). Значения IC50 свободных дендримеров для опухолевых клеток были сопоставимы или ниже значений IC50 для неопухолевых клеток. Данные результаты говорят об наличии собственной противоопухолевой активности у свободных дендримеров AE2G3 и BDEF33 *in vitro*.
6. Внесение свободных дендримеров повышало относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, TIM3,

CD47, в культурах линий Jurkat (оба дендримера), NCH644 (AE2G3). Таким образом, использование дендримеров может изменять экспрессию поверхностных маркеров опухолевых клеток.

7. Внесение комплексов катионных дендримеров с флуоресцентно меченной микроРНК amiR-155-FAM в культуры опухолевых клеток приводило к возрастанию доли FAM-позитивных клеток; эффект был более выражен для BDEF33, чем для AE2G3 в модели лейкемии; в модели глиобластомы AE2G3/amiR-155-FAM активнее проникали в клетки. Это свидетельствует о способности катионных дендримеров проникать и эффективно доставлять микроРНК в опухолевые клетки.

8. Культивирование опухолевых клеток в присутствии комплексов катионных дендримеров и микроРНК с противоопухолевыми свойствами приводило к гибели клеток. Дендриплексы на основе BDEF33 более токсичны, чем комплексы AE2G3, а использование amiR21 оказывается более эффективным для снижения жизнеспособности опухолевых клеток, чем miR34. Данные результаты говорят о наличии противоопухолевой активности дендриплексов в отношении различных опухолевых моделей (Т-клеточная лейкемия, глиобластома) и преимуществе использования синтетических ингибиторов микроРНК.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus

1. **Knauer, N.**; Meschaninova, M.; Muhammad, S.; Hänggi, D.; Majoral, J.-P.; Kahlert, U.D.; Kozlov, V.; Apartsin, E.K. Effects of dendrimer-microRNA nanoformulations against glioblastoma stem cells. *Pharmaceutics* 2023, *15*, 968, doi:10.3390/pharmaceutics15030968.

2. **Knauer, N.**; Pashkina, E.; Aktanova, A.; Boeva, O.; Arkhipova, V.; Barkovskaya, M.; Meschaninova, M.; Karpus, A.; Majoral, J.-P.; Kozlov, V.; et al. Effects of cationic dendrimers and their complexes with microRNAs on immunocompetent cells. *Pharmaceutics* 2023, *15*, 148, doi:10.3390/pharmaceutics15010148.

3. **Knauer, N.**; Arkhipova, V.; Li, G; Hewera M.; Pashkina E.; Nguyen P.-H.; Meschaninova, M.M.; Kozlov V.; Zhang W.; Croner R.S. et al. In vitro validation of the therapeutic potential of dendrimer-based nanoformulations against tumor stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, *23*, 5691, doi:10.3390/ijms23105691.

4. **Knauer, N.;** Pashkina, E.; Apartsin, E. Topological aspects of the design of nanocarriers for therapeutic peptides and proteins. *Pharmaceutics* 2019, *11*, 91, doi:10.3390/pharmaceutics11020091.
5. Апарцин, Е.К.; **Кнауэр**, Н.Ю. Методы доставки генетического материала в клетки и возможности их применения в генной терапии. *Гены и клетки*. 2016, *11*, 32–41.

Тезисы в журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus

1. **N. Knauer**, E. Pashkina, O. Boeva, A. Aktanova, V. Arkhipova, M. Meschaninova, J.P. Majoral, A-C. Nickel, S. Muhammad, D. Hänggi, U.D. Kahlert, V. Kozlov, E. Apartsin. 98P Cationic dendrimers as prospective vehicles of therapeutic nucleic acids into tumor cells: Approaches, advantages and challenges. Materials of ESMO TAT Congress 2023. ESMO Open. Volume 8, Issue 1, Supplement 2, 100956, 2023
2. **N. Knauer**, E. Pashkina, V. Kozlov, R. Gomez, A-M. Caminade, U. Kahlert, E. Apartsin. 49P Antitumor effects of cationic dendritic molecules and their complexes with microRNA in glioblastoma stem-like cells. Materials of ESMO TAT Congress 2022. Annals of Oncology, Volume 33, Supplement 1, S21-S22, 2022.
3. **Knauer, N.**, Pashkina, E., Boeva, O., Aktanova, A., Arkhipova, Meschaninova, M., Gomez, R., Sánchez-Nieves, J., Nickel, A.-C., Kahlert, U., Majoral, J.-P., Kozlov, V., Apartsin, E. PB2207: In vitro validation of dendrimer-based approach for micro-RNA delivery into leukemia cells. Materials of EHA Congress 2022. HemaSphere 6():p 2077-2078, June 2022. DOI: 10.1097/01.HS9.0000851656.23415.d9
4. **N Knauer**, E. Pashkina, A. Aktanova, O. Boeva, V. Arkhipova, M. Meschaninova, J. Sánchez- Nieves, R. Gómez, A. M. Caminade, E. Apartsin, V. Kozlov. Immunomodulatory effects of cationic dendrimers and their complexes with microRNA. Allergy, Volume 78, Issue S111. Special Issue: Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress, 1-3 July 2022, Pages: 1-752, February 2023
5. **N. Knauer**, E. Pashkina, O. Boeva, V. Arkhipova, A. Venyaminova, V. Kozlov, F. J. de la Mata, R. Gomez, E. Apartsin. EHA-2050. Dendrimer-mediated microRNA delivery impacts leukemia cells viability. Abstract Book: 25th Congress of the European Hematology

Тезисы в сборниках конференций

1. **N. Knauer**, V. Arkhipova, R. Gómez, J. Sánchez-Nieves, E. Pashkina, V. Kozlov, E. Apartsin, U. Kahlert. Dendrimers for microRNA delivery into human glioblastoma stem-like cells. 2nd CA17140 STSM virtual conference, 2022
2. **N. Knauer**, V. Arkhipova, R. Gómez, J. Sánchez-Nieves, E. Pashkina, P.-H. Nguyen, V. Kozlov, D. Hänggi, E. Apartsin, U. Kahlert. Amphiphilic triazine-carbosilane dendrons as perspective agents for glioblastoma treatment. Book of Abstracts: COST ACTION 17140 Working Group 2 online conference “Characterisation of nanomaterials towards safe and efficient nanodrugs“, 2021. DOI: <https://doi.org/10.18778/BOA>
3. Архипова В.И., **Кнауэр Н.Ю.**, Пашкина Е.А., Боева О.С., Веняминова А.Г., Санчес-Ньевес Х., Де ла Мата Ф.Х., Гомес Р., Апарцин Е.К. Триазин-карбосилановые дендримеросомы как перспективная платформа для доставки лекарств. В книге: VII международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020. 2020. С. 374-375.
4. **N. Knauer**, E. Pashkina, E. Apartsin, E. Fuentes, C. E. Gutierrez-Ulloa, M. Buyanova, F. J. de la Mata, R. Gómez. Topology-driven effects of carbosilane dendrimers and dendrons on immune cells. Book of Abstracts: 11th International Dendrimer Symposium, Funchal, Portugal, 2019
5. E. Apartsin, **N. Knauer**, E. Pashkina, V. Arkhipova, O. Boeva, J. Sánchez-Nieves, A. Venyaminova, F. Javier de la Mata, R. Gómez. pH-Sensitive Triazine-Carbosilane Dendrimerosomes for Anti-Cancer Drug Delivery. Book of Abstracts: First CA17140 COST conference Cancer Nanomedicine – from the Bench to the Bedside. Riga, Latvia, 2019