

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



КНАУЭР НАДЕЖДА ЮРЬЕВНА

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

3.2.7. – «Иммунология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
академик РАН,
д. м. н., профессор В. А. Козлов

Новосибирск

2023

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	6
1. Современные подходы к использованию микроРНК для задач иммунотерапии и противоопухолевой терапии (обзор литературы)	15
1.1. МикроРНК: свойства и функции	15
1.2. МикроРНК в регуляции иммунной системы и ее взаимодействии с опухолью	17
1.2.1. ImmunomiRs: как микроРНК регулируют иммунный ответ	17
1.2.2. МикроРНК, опухоль и ускользание от иммунологического надзора	21
1.3. Современные аспекты доставки терапевтических олигонуклеотидов: нанотранспортеры	28
1.3.1. Вирусные частицы как носители терапевтических олигонуклеотидов	29
1.3.2. Невирусные носители терапевтических олигонуклеотидов	32
1.4. Дендримеры как новая платформа для создания терапевтических систем	38
1.4.1. Дендримеры: структура и свойства.	38
1.4.2. Дендримеры и их собственная терапевтическая активность	40
1.4.3. Катионные дендримеры как носители терапевтических нуклеиновых кислот .	41
2. Материалы и методы	44
2.1. Общая информация об исследовании	44
2.1.1. Объект и предмет исследования.	44
2.2. Общая схема эксперимента	46
2.2.1. Исследование иммуномодулирующих свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК в модели МНК ПК условно здоровых доноров	46
2.2.2. Исследование противоопухолевых свойств катионных дендритных молекул и их комплексов с микроРНК в моделях глиобластомы и лейкемии	47
2.3. Описание экспериментальных методик	47
2.3.1. Реагенты, растворы и расходные материалы, использованные в исследовании	47
2.3.2. Приготовление рабочих растворов дендримеров и их комплексов с микроРНК (дендриплексов)	50
2.3.3. Выделение моноклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) условно здоровых доноров	51
2.3.4. Культивирование клеток in vitro	52
2.3.5. Окрашивание МНК ПК витальным красителем CFSE	54
2.3.6. Анализ экспрессии поверхностных клеточных маркеров методом проточной цитофлуориметрии	55
2.3.7. Оценка жизнеспособности клеток	55
2.3.8. Оценка индукции апоптоза	57
2.3.9. Оценка активности ЛДГ	57

2.3.10. Интернализация дендриплексов в МНК ПК	58
2.3.11. Оценка продукции перфорина и гранзима В	59
2.3.12. Оценка секреции цитокинов.....	59
2.3.13. Статистический анализ и визуализация данных	59
3. Результаты собственных исследований	60
3.1. Иммуномодулирующие свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК (МНК ПК условно здоровых доноров)	60
3.1.1. Оценка собственного токсического эффекта дендримеров	60
3.1.2. Оценка параметров интернализации микроРНК в МНК ПК.....	61
3.1.3. Оценка цитотоксических эффектов дендриплексов	62
3.1.4. Оценка влияния дендриплексов на субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток	64
3.1.5. Оценка влияния дендриплексов на экспрессию поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток	66
3.1.6. Оценка влияния дендриплексов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток	70
3.1.7. Краткие результаты раздела 3.1.....	71
3.2. Противоопухолевые свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК	73
3.2.1. Оценка влияния дендримеров на жизнеспособность опухолевых клеток	73
4.1.1. Влияние дендримеров на экспрессию поверхностных маркеров опухолевых клеток	77
4.1.2. Эффект дендримеров на секрецию IL-10 опухолевыми клетками	79
4.1.3. Оценка параметров интернализации микроРНК в опухолевые клетки	80
4.1.4. Оценка цитотоксического эффекта дендриплексов на опухолевые клетки	82
4.1.5. Оценка влияния дендриплексов на экспрессию поверхностных маркеров опухолевых клеток	89
4.1.6. Краткие результаты раздела 4.1.....	89
5. Обсуждение.....	91
5.1. Эффекты катионных дендримеров и дендриплексов на иммунокомпетентные клетки	91
5.2. Противоопухолевые свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК	94
Заключение.....	101
Выводы.....	103
Список литературы	105

Список сокращений

ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ДК	Дендритные клетки
ДМСО	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛДГ	Лактатдегидрогеназа
ЛПС	Липополисахарид
МАТ	Моноклональные антитела
МНК ПК	Мононуклеарные клетки периферической крови
мРНК	Информационная (матричная) РНК
НК	Нуклеиновые кислоты
ОМЛ	Острый миелоидный лейкоз
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ФГА	Фитогемагглютинин
anti-miR	Ингибитор микроРНК
APC	Allophycocyanin, аллофикоцианин
CD	Кластер дифференцировки
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester, сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand, лиганд CXС хемокина
Cy	Cyanine, цианин
DDAB	Dimethyldioctadecyl ammonium bromide, бромид диметилоктадециламмония
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, модифицированная среда Игла
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane, 1,2-ди-О-октадецен-3-метиламмонийпропан
Dox	Doxorubicin, доксорубин
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, этилендиаминтетрауксусная кислота
EGF	Epidermal Growth Factor, эпидермальный фактор роста
EV	Extracellular vesicles, внеклеточные везикулы, внеклеточные пузырьки
FCS	Fetal calf serum, фетальная бычья сыворотка
FDA	U.S. Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
FGF	Fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов
FITC	Fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат
FMO	Fluorescence Minus One
HMGB1	High mobility group protein 1
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR-isotype, человеческий лейкоцитарный антиген изотип DR
IFN γ	Interferon gamma, интерферон гамма
IL	Interleukin, интерлейкин
iPSCs	Induced pluripotent stem cells, индуцированные плюрипотентные клетки
LDH	Lactate dehydrogenase, лактатдегидрогеназа

MAPK	Mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа
MHC	Major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости
miR	МикроРНК
miRISC	miRNA-induced silencing complex
MMP	Matrix metalloproteinase, матричная металлопротеиназа
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form, восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата
NC	Non-coding control, олигонуклеотид, не имеющий комплементарной последовательности в геноме человека
NF-κB	Транскрипционный фактор "каппа-би"
NLRP	Nucleotide-binding oligomerization domain, нуклеотид-связывающий домен-рецептор олигомеризации
NTC	Non-treated control, необработанный контроль
Onco-miR	МикроРНК, обладающая протуморогенными свойствами, «онкомиР»
PAMAM	Polyamidoamine, полиамидамин
PBS	Phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер
PD-1	Programmed cell death protein 1, белок программируемой клеточной смерти 1
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1, лиганд белка программируемой клеточной смерти 1
PE	Phycocerythrin, фикоэритрин
PEI	Polyethylenimine, полиэтиленимин
PerCP	Peridinin chlorophyll protein, перидинин-хлорофилл-протеиновый комплекс
PFA	Paraformaldehyde, параформальдегид
PGLA	Poly(lactic-co-glycolic acid), сополимер полимолочной и полигликолевой кислоты
PI	Propidium iodide, йодид пропидия
RISC	RNA-induced silencing complex, РНК-индуцируемый комплекс выключения гена
siRNA	Small interfering RNA, малая интерферирующая РНК
TCR	T-cell receptor, Т-клеточный рецептор
Tfh	Follicular T-helpers, фолликулярные Т-хелперы
Th	T-helpers, Т-хелперные клетки, Т-хелперы
Th1	Т-хелперные клетки 1 типа
Th17	Т-хелперы 17
Th2	Т-хелперные клетки 2 типа
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-like receptor, толл-подобный рецептор
TME	Tumor microenvironment, опухолевое микроокружение
TMZ	Temozolomide, темозоломид
TNFα	Tumor necrosis factor-alpha, фактор некроза опухоли альфа
Treg	T-regulatory cells, Т-регуляторные клетки
VCAM	Vascular cell adhesion molecule, васкулярная молекула клеточной адгезии
VEGF	Vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

Введение

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

Иммунная система выполняет функцию «надзора» над опухолью [Schreiber, Old, Smyth, 2011; Zhang, Zhang, 2020]: иммунокомпетентные клетки, связанные как с адаптивным, так и врожденным иммунным ответом, входят в микроокружение опухоли (TME, tumor microenvironment) и сдерживают опухолевую прогрессию [Grivennikov, Greten, Karin, 2010; Seager и др., 2017]. При этом противоопухолевый эффект связан либо с прямым цитотоксическим воздействием, либо с изменением функциональной активности опухолевых клеток [Zhang, Zhang, 2020].

В то же время, опухолевые клетки активно используют механизмы, позволяющие уйти из-под надзора иммунной системы (т.н. immune escape), 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, Restifo, 2002; Rabinovich, Gabrilovich, Sotomayor, 2007].

Одной из наиболее известных молекул, связанных с уходом опухоли из-под надзора иммунной системы, является PD-L1, лиганд рецептора PD-1, обнаруженного на поверхности ряда иммунокомпетентных клеток; связывание лиганда с рецептором приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа [Heynckes и др., 2019; Litak и др., 2019]. Использование экспериментальных подходов, основанных на блокировании этих взаимодействий, приводило к снижению количества истощенных Т-клеток в опухолевом микроокружении, активации цитотоксического ответа и развитию иммунологической памяти [Park и др., 2019], что позволило ввести PD-1/PD-L1-ингибиторы в современную медицинскую практику [Delgado-Martín, Medina, 2020; Heynckes и др., 2019; Jiang и др., 2019; Karachi и др., 2019; Tobias и др., 2021; Zhang и др., 2023].

Схожими функциями обладает и другой негативный чекпойнт-регулятор – TIM-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3), чьими лигандами являются галектин-9, фосфатидилсерин, HMGB1 (high mobility group protein 1), CEACAM1 (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1) [Acharya и др., 2020; Wolf, Anderson, Kuchroo, 2020]. Повышение экспрессии TIM-3 на опухолевых клетках было описано как маркер ухудшения прогноза заболевания и развития резистентности к химиотерапии [Hung, Garzon-Muvdi, Lim, 2017; Li и др.,

2017a; Zhang и др., 2019], при этом вероятные механизмы связаны с функциональным истощением Т-клеток [He и др., 2018; Tang, Rangachari, Kuchroo, 2019], повышением секреции VEGF опухолевыми клетками [Kikushige, 2021], дифференциацией миелоидных супрессорных клеток в опухоль-ассоциированные макрофаги [Lei, Lee, 2021]. Кроме того, в настоящее время предполагается, что TIM3 может рассматриваться как один из маркеров опухолевых стволовых клеток [Kikushige и др., 2010; Li и др., 2017a]. Все вышеуказанное делает TIM-3 привлекательным кандидатом в мишени для иммунотерапии [Acharya и др., 2020; Anderson, 2014; He и др., 2018; Zang и др., 2021].

Еще один маркер, связываемый с уходом опухоли из-под иммунного надзора, – это Ig-подобный белок CD47 [Huang и др., 2020] – его связывание с молекулой с SIRPα на макрофагах, нейтрофилах и дендритных клетках приводит к снижению их фагоцитарной и антиген-презентирующей активности; таким образом, CD47-опосредованный сигналинг – это пример “do not eat me”-сигнала [Hu и др., 2020]. Данный маркер, активно экспрессируемый опухолевыми стволовыми клетками [Li и др., 2018; Liu и др., 2019], также связывают с ухудшением прогноза у пациентов [Eladl и др., 2020; Li и др., 2018]. В настоящее время разрабатываются подходы, предполагающие таргетирование CD47 для лечения опухолевых заболеваний [Huang и др., 2022; Jiang и др., 2021; Maute, Xu, Weissman, 2022; Qu, Li, Wang, 2022].

Таким образом, опухоль и ее микроокружение представляют собой сложную систему, в регуляции которой участвуют множество метаболических путей, каждый из этапов которых может быть потенциальной точкой для воздействия иммунотерапевтических методов, как со стороны опухоли, так и со стороны иммунокомпетентных клеток.

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 одноцепочечные олигонуклеотиды (18-25 нуклеотидов) с регуляторными свойствами. МикроРНК способны регулировать экспрессию различных генов за счет реализации таких процессов, как активация/подавление транскрипции (при связывании с ДНК), активации трансляции либо подавления трансляции и ко-трансляции, деаденилирования и деградации мРНК [Garzon, Marcucci, Croce, 2010; Gulyaeva, Kushlinskiy, 2016; Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018; Ji, Sun, Su, 2017; Labatut, Mattheolabakis, 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:*** наиболее привлекательным кандидатом на эту роль представляется miR-155. Экспрессия miR-155 увеличивается во время активации иммунокомпетентных клеток - Т и В лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток; она вовлечена в процесс выработки IFN γ NK-клетками после их активации [Pashangzadeh и др., 2021; Trotta и др., 2012]. Известно, что стимуляция TCR приводит к повышению уровня miR-155, эффекторные CD8⁺ клетки характеризуются более высокой экспрессией miR-155, чем наивные CD8⁺ клетки *in vivo* [Giri, Mahato, Cheng, 2019].
- ***Использование микроРНК с противоопухолевыми свойствами или их модификаций:*** Классическим примером микроРНК, подавляющей туморогенез, является микроРНК-34, чьей мишенью выступают белки, ингибирующие p53. Описано снижение экспрессии микроРНК-34 при многих опухолях (рак прямой кишки, РМЖ, рак предстательной железы, НМРЛ, остеосаркома, ХЛЛ, ММ, глиобластома); уровень экспрессии miR34 может служить прогностическим признаком [Zhang, Liao, Tang, 2019]. Использование miR-34 в различных опухолевых моделях приводило к замедлению роста опухоли и ее регрессии, восстановлению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии [Daige и др., 2014; Li и др., 2017b]. В настоящее время проводятся клинические испытания I фазы по исследованию эффективности miR-34-нагруженных липосом для лечения ряда солидных опухолей [Hong и др., 2020].
- ***Использование синтетических ингибиторов (amiRs) микроРНК, ассоциированных с развитием определенных видов опухолей (oncomiRs):*** В качестве цели для синтетических анти-микроРНК перспективно выглядит микроРНК-21, одна из наиболее известных onco-miR. Ее мишенями служат такие гены-супрессоры опухолевого роста, как TPM1, PDCD4, SERPINB5, PTEN, TIMP3, ANP32A, SMARCA4. Повышение экспрессии микроРНК-21 описано при ряде опухолей и также связывается с повышением резистентности к химиотерапии [Chan, Krichevsky, Kosik, 2005; Lawrie, 2013].

Таким образом, микроРНК можно рассматривать как многофункциональный инструмент для воздействия как на опухолевые, так и иммунокомпетентные клетки. МикроРНК могут эффективно захватываться клетками, при этом олигонуклеотиды имеют отрицательный заряд, что уменьшает риск неспецифического связывания с клеточными мембранами.

Задача доставки микроРНК значительно усложняется за счет их быстрой деградации в биологических средах. Внесение химических модификаций, снижающих распознавание нуклеазами, частично решает эту проблему, однако, потенциально может и ухудшать связывание микроРНК с таргетными последовательностями. В связи с этим разработан ряд подходов, предлагающих использование носителей вирусного и невирусного происхождения для транспорта микроРНК к целевым клеткам и тканям [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Zhang, Wang, Gemeinhart, 2013].

Одним из них стало использование катионных дендримеров – наноразмерных транспортеров полимерной природы специфической древообразной структуры, несущих положительный заряд на поверхности. Особенности синтеза дендримеров позволяют контролируемо вводить в структуру необходимые функциональные группы, добиваясь заданных химических свойств, дендримеры и их растворы стабильны при хранении, а их синтез может быть легко масштабируемым [Cramer, Adjei, Labhasetwar, 2015; Labatut, Mattheolabakis, 2018].

Катионные дендримеры способны нековалентно связывать отрицательно заряженные 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; Pedziwiatr-Werbicka и др., 2012; Serramía и др., 2015; Vacas-Córdoba и др., 2014], проапоптотических siRNA и ДНК-плазмид в опухолевые клетки [Białkowska и др., 2021; Caminade, 2020; Krasheninina и др., 2019].

В то же время данные о собственных биологических эффектах катионных дендримеров ограничены и разрознены. Несмотря на относительно подробную изученность анионных дендримеров и их влияния на иммунокомпетентные клетки, связанных, в основном, с подавлением воспалительных реакций [Caminade, 2017; Degboé и др., 2014; Fruchon и др., 2009; Hayder и др., 2011a; Hayder и др., 2011b], информация об эффектах катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК практически отсутствует. Аналогичный пробел существует и в отношении моделей опухолевых заболеваний: в настоящее время известно о токсическом эффекте фосфорных дендримеров по отношению к опухолевым клеткам, однако эти данные получены в основном в исследованиях с использованием комплексов дендримеров с противоопухолевыми субстанциями [Caminade, 2017]. Собственная противоопухолевая активность молекул обычно оказывалась вне фокуса внимания исследователей, схожая проблема существует и в отношении данных о собственных токсических эффектах карбосилановых дендримеров [Białkowska и др., 2021].

Направленное воздействие на клетки, обеспечивающие адаптивный и/или врожденный иммунный ответ, может быть перспективным методом для использования в иммунотерапии [Keshavan и др., 2019; Teunissen и др., 2021]. Такой подход мог бы стать эффективным инструментом как для воздействия на иммунокомпетентные клетки, так и на клетки опухолей, создавая возможности для комплексной терапии опухолевых заболеваний. Существующие литературные данные, однако, 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 полученных результатов и практическая значимость:

Впервые была проведена оценка биологических свойств фосфорного и карбосиланового дендримеров 3 поколения AE2G3 и BDEF33, а также их комплексов с терапевтическими олигонуклеотидами в отношении иммунокомпетентных и опухолевых клеток (Jurkat, BTSC233, JHH520, NCH644, GBM1, U87).

Впервые исследован эффект катионных дендримеров 3 поколения (AE2G3, BDEF33) и их комплексов с иммуномодулирующими микроРНК (miR-155, amiR-155) на жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови условно здоровых доноров, произведена оценка IC50 исследуемых дендримеров. Было обнаружено, что дендримеры обладают собственным дозозависимым токсическим эффектом, более выраженным для фосфорного дендримера AE2G3. В то же время их комплексы не изменяют значимо показатели жизнеспособности клеток (относительная жизнеспособность МНК ПК, активность ЛДГ в культуре МНК ПК, индукция апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов).

Впервые проведено исследование интернализации комплексов катионных дендримеров 3 поколения с микроРНК в иммунокомпетентные и опухолевые клетки, было показано, что дендримеры имеют различную эффективность интернализации в разных моделях: BDEF33 является более эффективным транспортером для доставки микроРНК в иммунокомпетентные клетки, в отношении опухолевых клеток доставка происходит более эффективно при использовании AE2G3.

Впервые был исследован эффект дендриплексов на основе катионных дендримеров и микроРНК с иммуномодулирующими свойствами на относительное количество клеток различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, CD19⁺, CD14⁺, CD16⁺CD56⁺) и их пролиферативной активности (CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ клетки); экспрессию поверхностных маркеров CD25, HLA-DR, PD-1 (относительное количество позитивных клеток среди субпопуляций CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ и CD19⁺ клеток); секрецию перфорина и гранзима В (субпопуляции CD3⁺CD8⁺, CD16⁺CD56⁺); продукцию цитокинов в культуре МНК ПК (IL-4, IL-10, TNF α , IFN γ). Было показано, что использование дендриплексов приводит к снижению относительной численности Т-регуляторных клеток, повышению доли клеток, экспрессирующих HLA-DR, PD-1 (CD4⁺HLA-DR⁺, CD4⁺PD1⁺, CD8⁺HLA-DR⁺, CD19⁺PD1⁺), повышению продукции IL-4. В то же время, пролиферативная активность Т-лимфоцитов, показатели относительного количества клеток с

фенотипом CD4⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺, CD8⁺Prf⁺, CD8⁺GrzB⁺, CD16⁺CD56⁺Prf⁺, CD16⁺CD56⁺GrzB⁺, секрета TNF α и IFN γ значимо не менялись.

Впервые было проведено исследование цитотоксической активности дендримеров и их комплексов с микроРНК, обладающими противоопухолевыми свойствами (miR-34, amiR-21), в отношении различных опухолевых культур (Jurkat, BTSC233, JHH520, NCH644, GBM1, U87). Было показано, что дендримеры обладают собственным дозозависимым токсическим эффектом в отношении опухолевых клеток, сопоставимый или превышающий таковой для стандартных химиопрепаратов (доксорубин, темозоломид). Также было показано, что опухолевые стволовые клетки глиобластомы (BTSC233, JHH520, GBM1) имели большую чувствительность к дендримерам, чем клетки линии U87.

Впервые были получены данные о влиянии дендримеров и их комплексов на относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры, характеризующих взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением (PD-L1, TIM-3, CD47): внесение свободных дендримеров повышало относительное количество клеток, экспрессирующих PD-L1, TIM3, CD47, в культурах линий Jurkat (оба дендримера), NCH644 (AE2G3), что может свидетельствовать о наступлении энергетического стресса опухолевых клеток. Внесение исследуемых дендриплексов снижало (тенденция) долю клеток линии GBM1, экспрессирующих PD-L1.

Данное исследование представляет собой первую доклиническую характеристику 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, в том числе для создания препаратов, обладающих высоким сродством к субпопуляции опухолевых стволовых клеток.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1. Отчетных конференциях аспирантов НИИФКИ, 2022-2023 гг.
2. Конференции участников программы научно-технических обменов Консорциума COST Nano2Clinic “From the bench to the bedside” Short-term Scientific Missions, 2022.
3. Конгрессах Европейского общества медицинской онкологии ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress 2022 и 2023.
4. Конгрессе Европейской гематологической ассоциации EHA Congress 2022.

5. Конгрессе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии EAACI Congress 2022.
6. Конференции Второй рабочей группы Консорциума COST Nano2Clinic “From the bench to the bedside”, 2020.
7. Конгрессе Европейской гематологической ассоциации EHA Congress 2020;
8. Конгрессе Европейского общества медицинской онкологии ESMO Immunology 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:

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.

Степень достоверности и личное участие автора

Результаты, представленные в данной диссертационной работе, получены лично автором на базе лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ (Новосибирск, Россия), Центра доклинических исследований Клиники нейрохирургии Медицинского факультета Университета Генриха Гейне (Дюссельдорф, Германия).

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием достаточного количества исследуемых образцов, использованием современных иммунологических, молекулярно-биологических методов и релевантных методов статистического анализа. Эксперименты, а также статистическая обработка результатов и интерпретация экспериментальных данных выполнены лично автором. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена лично автором.

Благодарности

Автор выражает признательность научному руководителю работы академику В.А. Козлову (НИИФКИ, Новосибирск) за чуткое и внимательное руководство, к.б.н. Е.А. Пашкиной (НИИФКИ, Новосибирск), к.х.н. Е.К. Апарцину (ИХБФМ, Новосибирск) и доктору У. Калерту (Университет Генриха Гейне, Дюссельдорф) за помощь в организации и осуществлении экспериментальной работы и интерпретации полученных данных, а также всем сотрудникам лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ и Центра доклинических исследований Университета Генриха Гейне за помощь в освоении экспериментальных методик, ценные замечания и поддержку в ходе работы.

1. Современные подходы к использованию микроРНК для задач иммунотерапии и противоопухолевой терапии (обзор литературы)

Последние годы стали временем интенсивного развития наномедицины – практического приложения нанотехнологии в решении задач медицины – диагностики и терапии целого ряда заболеваний. Этот подход предполагает использование наноразмерных (1-100 нм) конструкций, обладающих собственной активностью или являющихся комбинацией необходимой молекулы и наноразмерного носителя, для доставки в нужные клетки и/или ткани [Li и др., 2022].

Исторически одной из первых областей применения наномедицины стали опухолевые заболевания – в силу их высокой социальной значимости, а также определенного удобства при создании лабораторных моделей, однако перечень патологий, при лечении которых используется этот подход, непрерывно увеличивается. Изменились и подходы к самой терапии опухолей – если ранее основной мишенью выступали сами злокачественные клетки, то сейчас все более активно развивается идея иммунотерапии – воздействия на иммунокомпетентные клетки с целью модуляции противоопухолевого ответа [Abbott, Ustoyev, 2019; Sathyanarayanan, Neelapu, 2015; Teunissen и др., 2021].

1.1. МикроРНК: свойства и функции

Для решения задач наномедицины в целом и терапии опухолей в частности необходимо выбрать терапевтический инструмент, который мог бы эффективно влиять на метаболические и регуляторные пути в целевых клетках, при этом привлекательной кажется идея об одновременном воздействии на несколько мишеней. Этим требованиям отвечают микроРНК – короткие (около 18-22 нуклеотидов) эндогенные некодирующие РНК, активно участвующие в регуляции экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла, пролиферации, дифференцировки и метаболизма клеток [Gulyaeva, Kushlinskiy, 2016; Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018; Ji, Sun, Su, 2017; Labatut, Mattheolabakis, 2018].

Функциональная активность микроРНК в основном связана с активностью нуклеопротеинового комплекса miRISC (miRNA-induced silencing complex): связывание комплекса с мРНК за счет нековалентных комплементарных взаимодействий мРНК и микроРНК приводит к подавлению трансляции и деградации мРНК (отметим, что в отдельных случаях описано усиление трансляции после связывания мРНК с miRISC) [Bartel, 2004; Garzon, Marcucci, Croce, 2010; Ji, Sun, Su, 2017; Lee и др., 2017; Zhang, Wang, Gemeinhart, 2013]. В то же время, показаны и другие способы осуществления регуляторной активности микроРНК в клетке (см

Рисунок 1-1) – например, за счет секвестрации мРНК в тех регионах клетки, где не происходит активного синтеза белка, «снятия» рибосом с мРНК и прерывания синтеза белка, а также привлечения протеаз [Garzon, Marcucci, Croce, 2010; Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018; Zhang, Wang, Gemeinhart, 2013].

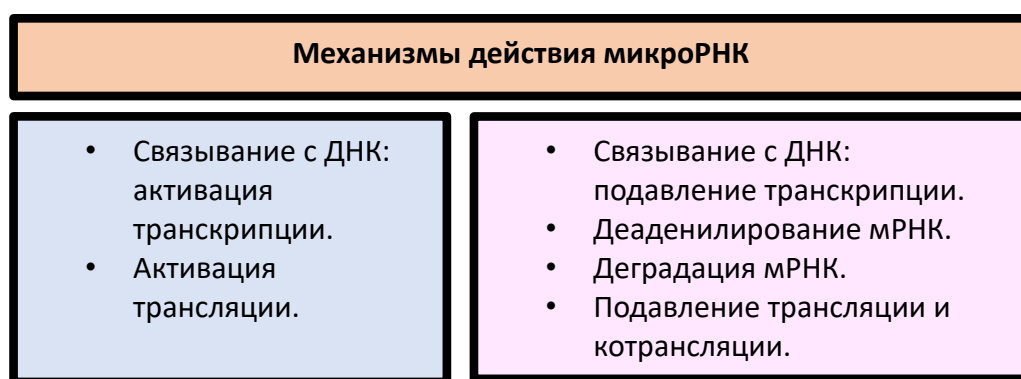


Рисунок 1-1. Механизмы регуляторной активности микроРНК в клетке (по Zhang, Wang, Gemeinhart, 2013).

Отметим важную черту, отличающую микроРНК от малых интерферирующих РНК (siRNA), и позволяющую одной микроРНК иметь несколько мишеней: для эффективного осуществления описанных выше регуляторных взаимодействий не требуется полной комплементарности микроРНК и целевой мРНК [Moraes и др., 2021; Zhang, Wang, Gemeinhart, 2013].

Таким образом микроРНК за счет вырожденности действия и множественности мишеней формируют сложную регуляторную сеть, работающую как внутри одной клетки, так и в тканях (внеклеточные микроРНК) [Garzon, Marcucci, Croce, 2010; Moraes и др., 2021]. Отметим, что при переводе вопроса в практическую плоскость и обсуждении терапевтического потенциала микроРНК эти молекулы могут быть не только основой для лекарственного препарата, но и мишенью для ингибирования синтетическими антагонистами микроРНК [Ban, Kwon, Kim, 2019; Dasgupta, Chatterjee, 2021; Moraes и др., 2021; Niccolini и др., 2022].

1.2. МикроРНК в регуляции иммунной системы и ее взаимодействии с опухолью

Одной из важнейших областей изучения свойств микроРНК является исследование их активности по отношению к иммунной системе. Согласно современным представлениям, микроРНК рассматриваются как неотъемлемые участники регуляторных сетей как в норме, так и при развитии каких-либо заболеваний [Hoefig, Heissmeyer, 2008; Mehta, Baltimore, 2016]. Отметим, что это касается не только вопросов взаимодействий между компонентами собственно иммунной системы, но и взаимодействий иммунокомпетентных клеток с опухолями, так, например, одно из направлений современной онкологии изучает роль микроРНК как участников ускользания опухоли от иммунного ответа [Eichmüller и др., 2017; Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018].

1.2.1. ImmunomiRs: как микроРНК регулируют иммунный ответ

Показано, что микроРНК принимают участие в регуляции таких ключевых иммунологических процессов, как развитие, дифференцировка, активация, функционирование и старение клеток врожденного и адаптивного иммунитета [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018; Mehta, Baltimore, 2016; O'Connell и др., 2010; Paladini и др., 2016]. Исследователи выделяют группы или кластеры микроРНК, объединенных общими функциями, в том числе, и в отношении иммунной системы – иммуномиRs (immune-miRs) [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018] (см Таблица 1-1).

Таблица 1-1. Кластеры иммуномиRs и их влияние на различные звенья иммунной системы (по Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018).

иммуномиRs	Иммунологический эффект
Кластер miR-23-24-27	↑ Коммитирование в миелоидном направлении ↓ Дифференциация лимфоидных клеток ↓ Эффекторная функция CD8 ⁺ Т-клеток ↓ Th2-ответ
miR-23, miR-27	↓ Дифференцировка и функционирование Th1/Th17/Treg
miR-24	↑ Дифференцировка Th1/Th17/Treg
miR-146a	↓ Функционирование TNFα и IL-6-опосредованных путей ↓ Активность NF-κB ↓ Дифференцировка Th1-клеток ↓ Th1-провоспалительный ответ
miR-155	↑ Активность NF-κB

	↑ Накопление и активация эффекторных Т-клеток ↑ Функционирование Th17-клеток
miR-17~92	↑ Th1-ответ ↑ Пролиферация и выживание эффекторных Т-клеток ↑ Продукция Th2-цитокинов ↓ Дифференцировка Treg ↑ Миграция, дифференцировка и функционирование Tfh-клеток ↑ Развитие и выживание В-клеток ↓ Дифференцировка макрофагов
miR-223	↓ Гранулоцитарный провоспалительный ответ ↓ NF-κB-, TLR-, MAPK-сигналинг ↓ Активность NLRP инфламмасомы ↑ TCR-опосредованный сигналинг
miR-181	↓ Дифференцировка Th1-клеток ↑ Развитие Treg ↑ M2-поляризация макрофагов
↑ - активация, усиление; ↓ - супрессия, подавление описываемого процесса	

Кластер miR-23-24-27 объединяет miR-23a, miR-24-2, miR-27a, miR-23b, miR-24-1, miR-27b, находящиеся во взаимодействии с транскрипционными факторами, влияющими на регуляцию коммитирования клонов иммунных клеток [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018]. Так, фактор PU.1, поддерживающий дифференциацию миелоидных клеток, оказывает индуцирующее влияние на экспрессию микроРНК данного кластера [Kong и др., 2010], напротив, лимфоидные факторы транскрипции (EBF1, E2A и PAX5) демонстрируют обратный эффект [Kurkewich и др., 2017]. В свою очередь мишенями микроРНК кластера 23-24-27 выступают другие транскрипционные факторы (Runx1, Satb1, Bach1 и Ikzf1). Данные микроРНК подавляют дифференцировку лимфоидных клеток и поддерживают коммитирование в миелоидном направлении и пролиферацию клона [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018].

Представители кластера обладают супрессивной активностью в отношении Th2 Т-лимфоцитов, подавляя экспрессию IL-4 и целого ряда факторов, в том числе фактора транскрипции GATA3 [Cho и др., 2016; Guerau-de-Arellano и др., 2011; Pua и др., 2016]. Ранее было показано, что miR-24 способствует дифференцировке Th1, Th17 и Т-регуляторных клеток, таргетируя регуляторный белок TCF1 (T cell factor 1) [Cho и др., 2016; Cho и др., 2017], при этом

miR-23 и miR-27 подавляют Treg/Th17 дифференцировку и функцию Th1 [Cho и др., 2016; Cruz и др., 2017; Rogler и др., 2009].

МикроРНК данного кластера негативно влияют на эффекторную функцию CD8⁺ Т-клеток, подавляя IFN γ прямым (miR-24, miR-27a) и непрямым (miR-23a) образом [Chandran и др., 2014; Lin и др., 2014]. miR-23b поддерживает толерогенные свойства дендритных клеток, подавляя Notch1- и NF- κ B-ассоциированные сигнальные пути [Zheng и др., 2012].

Другой кластер объединяет miR-146a и miR-155, активно вовлеченные в регуляцию клеток врожденного и адаптивного иммунитета [Cerpi и др., 2009; O'Connell и др., 2007; O'Connell, Zhao, Rao, 2011]. Они закодированы в разных участках генома, но тесно взаимосвязаны, при этом miR-146a ассоциирована с противовоспалительными эффектами, а miR-155 – с провоспалительными [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018].

miR-146 выступает негативным регулятором TNF α и IL-6 путей, воздействуя на ряд сигнальных молекул (IRAK1/2, TRAF6, MyD88, TLRs, NOTCH1), что подавляет процессы дифференцировки клеток врожденного иммунитета и их провоспалительную активность [He и др., 2014; Hou и др., 2009; Taganov и др., 2006]. Было показано, что miR-146a имеет супрессивное влияние на дифференцировку Th1-клеток [Möhnle и др., 2015]; в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах подавление экспрессии miR-146a приводила к выраженному повышению экспрессии IFN γ [Huffaker и др., 2012]. Обнаружено, что miR-146a выступает в роли участника петли обратной связи, ограничивающей активность NF- κ B в Т-клетках после их активации, подавляя активаторы NF- κ B TRAF6, IRAK1, FADD; при этом взаимодействие с фактором FADD способно запускать гибель Т-лимфоцитов (activation-induced cell death, AICD) [Boldin и др., 2011; Curtale и др., 2010; Yang и др., 2012].

miR-155 необходима для формирования иммунного ответа [Okada, Kohanbash, Lotze, 2010]: подавляя прямую активность супрессорного фактора SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1) miR-155 способствует усилению продукции IFN γ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками; взаимодействие с SOCS-1 связано и с поддержанием субпопуляции Т-регуляторных клеток [Dudda и др., 2013; Huffaker и др., 2012; Lu и др., 2009]. Данная микроРНК активирует продукцию цитокинов в Th17-клетках, подавляя ингибирующие эффекты ДНК-связывающего белка Jarid-2 [Escobar и др., 2014].

Обе микроРНК-представительницы кластера формируют сложную регуляторную сеть, модулирующую экспрессию NF- κ B в макрофагах: активация NF- κ B приводит к усилению экспрессии miR-155, которая, будучи «нацеленной» на факторы SHIP1 и SOCS1, стимулирует NF- κ B-сигналинг, формируя петлю положительной обратной связи. Со временем это приводит к

повышению экспрессии miR-146 и «выключению» сигнального каскада miR-155 за счет прямого взаимодействия с факторами IRAK1 и TRAF6 [Mann и др., 2017].

Кластер miR-17~92, расположенный на хромосоме 13, кодирует транскрипт полицистронной микроРНК, который дает шесть отдельных продуктов: miR-17, miR-18a, miR-19a/b, miR-20a и miR-92 [Jiang и др., 2011]. Данный кластер играет важную роль в формировании провоспалительного иммунного ответа Т-клетками. Индуцированные при активации NF-κB члены кластера прямо воздействуют на важные регуляторные молекулы сигнальных путей JAK-STAT и NF-κB, что приводит к развитию ряда эффектов: стимуляции пролиферации и выживания эффекторных Т-клеток, усиление продукции Th1- (IFNγ) и Th1-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13), ингибирование дифференцировки Т-регуляторных клеток [Gantier и др., 2012; Jiang и др., 2011; Simpson и др., 2014; Skinner, Keown, Chong, 2014; Xiao и др., 2008; Zhou и др., 2010]. Более того, было показано, что miR-17, регулируя экспрессию ко-регуляторного транскрипционного фактора FoxP3 Eos, связана с контролем супрессорной активности Т-регуляторных клеток [Yang и др., 2016]. Подавление экспрессии кластера miR-17~92 в В-клетках приводит к повышению уровня проапоптотического белка Vim и ингибированию В-клеточного лимфопозеза [Ventura и др., 2008]. miR-17~92, воздействуя на факторы HIF-1α и HIF-2α, также нарушает дифференцировку макрофагов, особенно, в условиях воспаления и гипоксии [Poitz и др., 2013].

miR-223 считается классическим примером микроРНК, связанной с модулированием врожденного иммунитета; первоначально выявляемая только в клетках гранулоцитарного ряда, в дальнейшем была описана как важный участник регуляции численности и функциональной активности моноцитов и макрофагов [Chen и др., 2004; Fukao и др., 2007; Johnnidis и др., 2008; O'Connell, Zhao, Rao, 2011]. На протяжении процесса дифференцировки гранулоцитов уровень экспрессии miR-223 непрерывно возрастает, при этом микроРНК выступает негативным регулятором активности гранулоцитов при развитии воспалительной реакции, регулируя активность фактора транскрипции Mef2c: так было показано, что мыши с дефицитом miR-223 имеют гипервоспалительные нарушения, их гранулоциты описываются как «сверхчувствительные к активирующим воздействиям» [Johnnidis и др., 2008]. Напротив, жизненный цикл моноцитов/макрофагов сопровождается постоянным снижением уровня miR-223, активацией мишени miR-223 фактора IKKα, что приводит к подавлению неканонического NF-κB сигналинга, предотвращая гиперактивацию макрофагов [Li и др., 2010]. При стимуляции макрофагов экспрессия miR-223 подавляется, что усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-18, TNFα) [Neudecker и др., 2017; Zhang и др., 2017]. Все вышесказанное позволяет считать miR-223 микроРНК с противовоспалительными свойствами.

Также с регуляцией противовоспалительного ответа связана **miR-181**, экспрессирующаяся в зрелых иммунокомпетентных клетках [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018]. В Т-клетках miR-181 связана с усилением TCR-зависимой активации за счет возрастания силы сигнала и увеличения чувствительности к нему [Li и др., 2007]. При этом подавление экспрессии miR-181 в тимусе приводит к снижению порога чувствительности TCR и, как следствие, созреванию аутореактивных Т-клеток [Ebert и др., 2009]. В течение жизни Т-клеток в стареющих CD4⁺ лимфоцитах уменьшение экспрессии miR-181 сопровождается возрастанием экспрессии фосфатазы DUSP6 (dual specificity phosphatase 6) и ослаблению ERK-опосредованного сигналинга; результатом этих изменений становится снижение передачи сигнала активации через TCR [Li и др., 2012]. Было показано, что miR-181, чьей мишенью является Smad7, негативный регулятор передачи сигналов TGF- β , ингибирует дифференцировку Th1-клеток и способствует формированию пула Т-регуляторных клеток [Ghorbani и др., 2017].

В качестве непосредственных мишеней miR-181 в макрофагах выступают Kruppel-подобный фактор 6 (KLF6) и фактор C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein- α), таким образом, miR-181 способствует M2-поляризации макрофагов, подавлению секреции TNF α , IL-1 α β [Bi и др., 2016; Ghorbani и др., 2017; Xie и др., 2013; Zhu и др., 2017]. По-видимому, противовоспалительные эффекты miR-181 дополнительно опосредованы подавлением передачи сигналов NF- κ B путем прямого нацеливания на импортин $\alpha 3$ и лизиндеубиквитиназу (CYLD) [Su и др., 2017b; Sun и др., 2012].

Описанные выше микроРНК – это важные медиаторы активности иммунной системы, работающие «изнутри» - они продуцируются самими иммунокомпетентными клетками. В то же время модулировать иммунный ответ могут и «внешние» микроРНК, например продукты опухолевых клеток, позволяющие им «ускользнуть» от внимания иммунной системы [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018]. Обзору этих эффектов будет посвящен следующий раздел.

1.2.2. МикроРНК, опухоль и ускользание от иммунологического надзора

Как уже отмечалось выше, помимо стимуляции иммунного ответа микроРНК могут нести и другие функции. Иммуносупрессорная активность микроРНК – важная составляющая ухода опухоли от контроля иммунной системой (immune escape), при этом источником олигонуклеотидов могут быть как опухолевые клетки, так и клетки, формирующие опухолевое микроокружение, в том числе, и иммунокомпетентные. В то же время, описаны и микроРНК, обладающие противоопухолевой активностью.

1.2.2.1. Опухолевые клетки как источник иммуносупрессорных микроРНК

В настоящее время известно, что опухолевые клетки способны продуцировать микроРНК, влияющие на активность иммунного микроокружения (см Таблица 1-2).

Таблица 1-2. Опухоль-ассоциированные miRs, влияющие на иммунное микроокружение опухоли (по Andaloussi EL и др., 2013).

miR	Мишень	Влияние на иммунную систему	Модель опухоли
miR-24-3p	FGF11	Индукция Tregs ↑ Th1/Th17-дифференцировка ↓ Пролиферация Т-клеток ↓	Назофарингеальная карцинома
miR-210	HIF1α IL16 CXCL12	Th17-дифференцировка ↑ Рекрутирование миелоидных супрессорных клеток, осуществление их супрессорных функций ↑	Назофарингеальная карцинома Меланома, рак молочной железы
miR-23a	BLIMP1-1	Эффекторная функция CD8 ⁺ Т-клеток ↓	Рак легких
miR-34a	CCL22	Рекрутирование Tregs ↓	Гепатоцеллюлярная карцинома
miR-214	PTEN	Экспансия Tregs ↑	Различные модели
miR-494	PTEN	Рекрутирование миелоидных супрессорных клеток, осуществление их супрессорных функций ↑	Рак молочной железы
miR-20a/-17-5p	STAT3	Супрессорная функция миелоидных супрессорных клеток ↓	Рак толстой кишки
miR-155	HIF1	Супрессорная функция миелоидных супрессорных клеток ↓	Меланома, рак легких

miR	Мишень	Влияние на иммунную систему	Модель опухоли
miR-25-3p	NF-κB?	Продукция IL-6 опухоль-ассоциированными макрофагами ↑	Липосаркома
miR-92a-3p	NF-κB?	Продукция IL-6 опухоль-ассоциированными макрофагами ↑	Липосаркома
miR-222-3p	SOCS3	M2-поляризация опухоль-ассоциированных макрофагов ↑	Рак яичников
miR-203	TLR4?	Продукция цитокинов дендритными клетками ↓	Рак поджелудочной железы
miR-212-3p	RFXAP	Индукция толерантности дендритными клетками ↑	Рак поджелудочной железы
miR-183	DAP12	Эффекторная функция NK-клеток ↓	Рак легкого
↑ - активация, усиление; ↓ - супрессия, подавление описываемого процесса			

Опухолевые клетки активно продуцируют внеклеточные пузырьки – экзосомы (tumor-derived exosomes, TEX) – которые нагружены биогенными молекулами, несущими функцию иммуносупрессорных сигнальных молекул [Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018; Whiteside, 2016]. Интересно, что удельная доля микроРНК в экзосомах может отличаться от таковой в опухолевых клетках, что, по-видимому, может указывать на существование механизмов активной секреции [Li и др., 2013].

В настоящее время известно, что микроРНК, продуцируемые опухолевыми клетками, могут влиять на дифференцировку и функционирование CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Так, было показано, что циркулирующие экзосомы пациентов с назофарингеальной карциномой имели более высокий уровень miR-24-3p по сравнению со здоровыми донорами. Эти экзосомы ингибировали пролиферацию Т-клеток, как и дифференцировку Th1 и Th17 (белком-мишенью при этом был FGF11); при этом подавление экзосомальной miR-24-3p устраняло эти эффекты [Ye и др., 2016]. Другими эффектами воздействия этих экзосом оказывалось снижение продукции IFNγ, IL-2 и IL-17 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками [Ye и др., 2014]. Ряд опухолей активно продуцирует miR-214, которая, будучи доставленной в Т-клетки, подавляет активность фактора PTEN и способствует экспансии Т-регуляторных клеток [Yin и др., 2014].

Опухоль-ассоциированные макрофаги (tumor associated macrophages, TAM) считаются важными игроками в процессе развития опухоли и ее прогрессии: при инициации туморогенеза они имеют M1-фенотип, способствуя формированию воспалительного про-мутагенного окружения. В дальнейшем макрофаги приобретают M2-фенотип, стимулируя ангиогенез, усиливая миграцию и инвазию опухолевых клеток, метастазирование опухоли, подавляя

противоопухолевый иммунный ответ [Noy, Pollard, 2014]. При этом макрофаги как сами продуцируют микроРНК, воздействующие на опухоль [Aucher, Rudnicka, Davis, 2013; Yang и др., 2011], так и являются реципиентами микроРНК-сигналов от опухоли [Chen и др., 2017; Su, Aldawsari, Amiji, 2016; Vos Van Der и др., 2016]. Так, секретируемые клетками липосаркомы пузырьки содержат miR-25-3p и miR-92a-3p, которые стимулируют секрецию IL-6 макрофагами TLR7/8-зависимым образом, это, в свою очередь, усиливает рост и инвазию липосаркомы [Casadei и др., 2017]. Исследователями был показан вклад экзосомальных микроРНК опухолевого происхождения в M2-поляризацию макрофагов: miR-940 и miR-222-3p в модели рака яичника [Chen и др., 2017; Ying и др., 2016], miR-155 и miR-125b-2 в модели рака поджелудочной железы [Ying и др., 2016].

Аналогичным образом регуляторным воздействиям опухоли подвергаются и другие участники иммунного ответа. Так, например, опухолевые экзосомы, нагруженные miR-203, негативно регулировали экспрессию TLR4, продукцию TNF- α и IL-12 в дендритных клетках; ингибирование экспрессии RFXAP посредством miR-212-3p приводило к снижению экспрессию МНС II и индукции толерогенных свойств у дендритных клеток [Ding и др., 2015; Zhou и др., 2014]. miR-183 в NK-клетках человека подавляет транскрипцию и трансляцию DAP12, что приводит к снижению цитолитической активности клеток [Donatelli и др., 2014].

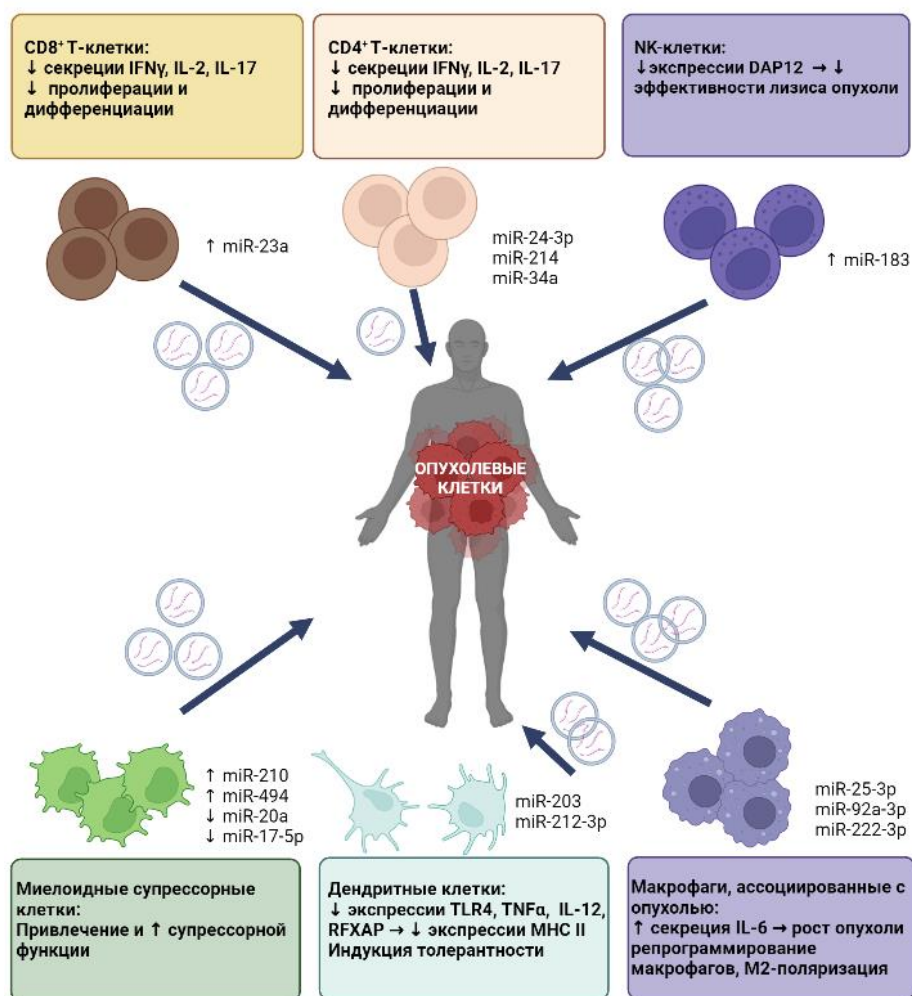


Рисунок 1-2. Варианты ухода опухоли от иммунного контроля за счет секреции иммуносупрессорных микроРНК (no Hirschberger, Hinske, Kreth, 2018).

Но микроРНК могут обладать регуляторными свойствами и по отношению к самим опухолевым клеткам, при этом можно выделить микроРНК с противоопухолевой активностью (опухолевые супрессоры) и с проонкогенной активностью (oncomiRs) [Esquela-Kerscher, Slack, 2006]. Отметим, что в зависимости от вида опухоли микроРНК могут иметь различные (а порой и совершенно противоположные) функции [Narayan, Bracken, Ekert, 2018; Zhang, Liao, Tang, 2019].

1.2.2.2. OncomiRs – микроРНК, участвующие в туморогенезе

Пожалуй, самым известным примером этой разновидности микроРНК является miR-21, чья антиапоптотическая активность была впервые показана в модели глиобластомы [Chan, Krichevsky, Kosik, 2005], а дальнейшие исследования подтвердили ее участие в канцерогенезе многих других опухолей [Lawrie, 2013]. Мишенью miR-21 являются гены-супрессоры опухоли: TPM1 (tropomyosin 1), PDCD4 (programmed cell death 4), SERPINB5 (maspin) в моделях рака молочной железы и лимфомы; PTEN в модели гепатоцеллюлярной карциномы и NK/Т-клеточной

лимфомы; TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) в модели глиомы; ANP32A и SMAR-CA4 в модели В-клеточной лимфомы, а также некоторые участники p53- и TGF β -ассоциированных путей, регулирующих апоптоз [Lawrie, 2013]. Кроме того, по-видимому, miR-21 связана с развитием резистентности опухолей к химиотерапии, а подавление экспрессии микроРНК приводило к регрессу опухоли.

Другим примером (и весьма неожиданным) оказывается miR-155 [Lawrie, 2013; Okada, Kohanbash, Lotze, 2010]: ранее она описывалась как микроРНК, активирующая иммунный ответ, в то же время ряд исследований показали повышение ее экспрессии при некоторых гемобластозах [Lawrie, 2013; Narayan, Bracken, Ekert, 2018], в ряде солидных опухолей [Liu и др., 2015; Mattiske и др., 2012].

Мишенями для miR155 являются такие факторы, как SMAD5, участник PI3K/AKT-пути PI3K/PI3K1 и инозитол-5-фосфатаза 1 (INPP5D), содержащая домен гомологии-2 Src (также известную как SHIP1) [Lawrie, 2013]. miR-155 может выступать промотором пролиферации, инвазии, миграции опухолевых клеток (показано в модели глиомы), подавляя их апоптоз и активируя PI3K/AKT-сигнальный путь [Wu, Wang, 2020]. При этом анти-miR155 препараты показали эффективность в мышинной модели В-клеточной лимфомы [Babar и др., 2012]. Возможное объяснение такого противоречия в направленности эффектов микроРНК может быть связано с количественным уровнем экспрессии: в работе Narayan и соавт в модели ОМЛ было показано, что уровень экспрессии miR-155, превышающий контрольный уровень в 10-50 раз, был связан с ухудшением течения заболевания у детей, в то время как превышение более, чем в 50 раз по сравнению с контролем ассоциировалось со снижением клоногенного потенциала опухолевых клеток и снижением их пролиферативной активности *in vitro* [Narayan, Bracken, Ekert, 2018].

1.2.2.3. микроРНК и противоопухолевый ответ

В то же время, безусловно, существуют и микроРНК, обладающие противоопухолевой активностью. Наиболее важной и известной из них является miR-34, снижение экспрессии которой было выявлено при многих опухолях (рак прямой кишки, РМЖ, рак предстательной железы, НМРЛ, остеосаркома, ХЛЛ, ММ, глиобластома), при этом сниженный уровень экспрессии miR34 может служить плохим прогностическим признаком [Zhang, Liao, Tang, 2019].

miR-34 тесно связана с активностью проапоптотического белка p53, при этом как p53 обладает активирующим действием на микроРНК, так и сама miR-34 регулирует экспрессию ряда p53-зависимых генов, формируя таким образом петли положительной обратной связи [Navarro, Lieberman, 2015]. Кроме того, мишенями miR-34 могут выступать молекулы, обуславливающие

пролиферацию и инвазию опухоли, а также процесс эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-mesenchymal transition, EMT) (виментин и Е-кадгерин в моделях рака мочевого пузыря и рака прямой кишки) [Zhang, Liao, Tang, 2019]. Введение аналогов (мимиков) miR-34 в модели Hep3В и HuH7-индуцированных опухолей печени у мышей приводило замедлению опухолевого роста и регрессии опухолей [Daige и др., 2014], а индукция экспрессии miR-34 в адриамицин-резистентных клетках MCF-7 восстанавливало их чувствительность к химиотерапии [Li и др., 2017b].

Таким образом, микроРНК можно рассматривать как многофункциональные и гибкие в применении модуляторы для регуляции активности иммунокомпетентных или опухолевых клеток, а также их взаимодействия. Указанные характеристики делают микроРНК по-настоящему перспективным инструментом для исследователей, пытающихся воздействовать на метаболические пути в клетках, связанные с формированием патологических состояний.

Сами по себе эти молекулы обладают высокой эластичностью, что способствует более эффективному захвату клетками [Anselmo, Mitragotri, 2017], а наличие отрицательного заряда у молекулы РНК уменьшает риск неспецифического связывания с отрицательно же заряженными клеточными мембранами (например, неопухолевых клеток) и, как следствие, уменьшается общий токсический эффект, что особенно важно при создании, например, противоопухолевых препаратов [Ху и др., 2018]. Современные синтетические подходы позволяют легко синтезировать любые микроРНК в нужных количествах, что также делает их привлекательным объектом для биотехнологического производства.

В то же время терапевтические конструкции на основе нуклеиновых кислот имеют ряд существенных недостатков (см **Таблица 1-3**), главным из которых является их быстрая деградация в биологических средах за счет активности нуклеаз [Ban, Kwon, Kim, 2019; Moraes и др., 2021; Zhang, Wang, Gemeinhart, 2013]. Частично это может быть решено за счет введения дополнительных химических модификаций, препятствующих распознаванию РНК нуклеазами [Ху и др., 2018; Ban, Kwon, Kim, 2019], однако это может изменить биологическую активность молекулы.

Таблица 1-3. Основные трудности при доставке терапевтических нуклеиновых кислот и возможные пути их преодоления (по Wang и др., 2015; Zhang, Wang, Gemeinhart, 2013).

Проблема	Путь решения
Путь введения	Местное использование
	Внутривенное введение

Деградация и элиминация	Местное использование Иммобилизация на носителе Контроль формы, размера и заряда частицы, ее стерической стабильности Химические модификации
Накопление в патологическом очаге	Местное использование Направленная (таргетная) доставка Контроль за размером частиц
Проникновение в клетку	Таргетирующие лиганды Использование неспецифических взаимодействий Использование пенетрирующих лигандов
Деградация в эндосомах/лизосомах	Высвобождение из эндосом: литические липиды, фузогенные пептиды, фузогенные полимеры, осмотический лизис Эндосомальный арест, ингибирование лизосом Направленная (таргетная) доставка MVB (multivesicular bodies)
Локализация в клетке	Направленная (таргетная) доставка MVB (multivesicular bodies) для реализации функции комплекса RISC

Таким образом более предпочтительным вариантом представляется использование дополнительных носителей, которые не только защищали бы транспортируемые молекулы, но и, например, улучшали ее захват целевыми клетками. Их описанию мы посвятим следующий раздел.

1.3. Современные аспекты доставки терапевтических олигонуклеотидов: нанотранспортеры

Существующие в настоящее время носители терапевтических нуклеиновых кислот могут быть условно разделены на две большие группы: вирусные векторы, переносящие нуклеиновые кислоты внутри частицы, и транспортеры невирусного происхождения, как правило, связывающие нуклеиновые кислоты за счет формирования нековалентных электростатических взаимодействий [Ban, Kwon, Kim, 2019; Dasgupta, Chatterjee, 2021; Moraes и др., 2021]. Нередко ко второй группе относят конъюгаты НК с различными адресующими молекулами, улучшающими параметры транспорта. Однако, строго говоря, этот вариант должен рассматриваться отдельно, так как дополнительные группы вводятся за счет формирования ковалентных связей, при этом самого «носителя» нет как такового, в связи с чем они не будут рассматриваться в данном обзоре.

1.3.1. Вирусные частицы как носители терапевтических олигонуклеотидов

Сама структура вируса как частицы с заключенным внутри генетическим материалом подталкивает к идее использования этого принципа для генной терапии. Генетически модифицированные вирусы, патогенные детерминанты которых были удалены из генома, эффективно доставляют целевые трансгены в клетки и ткани, обеспечивая высокий уровень экспрессии нужного продукта в течение продолжительного времени [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Moraes и др., 2021]. Наиболее часто для задач генной терапии используются частицы на основе ретро-, ленти-, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Fu, Chen, Huang, 2019; Yang, 2015], а также векторы на основе бактериофагов [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Pan и др., 2012a; Sun, Sun, Zhao, 2017].

Одним из первых использованных исследователями инструментов для переноса генов, кодирующих микроРНК, в делящиеся клетки стали ретровирусные векторы (RV), вирион которых покрыт дополнительной липопротеиновой оболочкой (envelop) [Yang, 2015]; наиболее часто RV разрабатываются на основе вируса мышинного лейкоза Молони (Moloney murine leukemia viruses, MoMLVs), имеющего относительно простую структуру [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. После того, как вирусная частица связывается с поверхностными клеточными рецепторами, содержимое капсида проникает внутрь клетки, вирусная РНК становится матрицей для построения двухцепочечного фрагмента ДНК, который затем встраивается случайным образом в геном хозяина. Данный подход был успешно опробован в ряде исследований, связанных, например, с регенеративной медициной: так, индуцированная с помощью ретровирусного вектора экспрессия miR-138 в эмбриональных фибробластах мыши приводила к подавлению p53-опосредованного сигнального пути и позволила получить популяцию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [Ye и др., 2012].

В то же время процесс случайного встраивания ретровирусных векторов в геном сопряжен с риском инсерционного мутагенеза вследствие инактивации критически важных генов или их регуляторных элементов, что является серьезным недостатком данной системы доставки [Cavazzana-Calvo и др., 2000; Dasgupta, Chatterjee, 2021; Hacein-Bey-Abina и др., 2003]. Кроме того, эти векторы могут работать лишь в делящихся клетках, ядерная мембрана которых частично разрушается во время митоза [Dasgupta, Chatterjee, 2021], что значительно ограничивает область их применения.

Одним из путей преодоления этих трудностей стало использование представителей рода лентивирусов (также относятся к семейству ретровирусов) [Dasgupta, Chatterjee, 2021], включая вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ-2), обезьян (SIV), кошек (FIV), лошадей (EIAV) и

крупного рогатого скота (BIV) [Berkowitz и др., 2001; Leroux, Cadore, Montelaro, 2004; Mangeot и др., 2000; Poeschla и др., 1998; Poeschla, Wong-Staal, Looney, 1998]. Важной особенностью этой разновидности ретровирусов является то, что они способны проникать через поры неповрежденной ядерной мембраны, что позволяет использовать их для переноса трансгенов как в покоящиеся, так и в делящиеся клетки [Milone, O'Doherty, 2018]. Несмотря на сохраняющуюся опасность развития «генотоксических» эффектов и запуска инсерционного онкогенеза [Baum и др., 2003; Kalle von и др., 2004], предполагается, что для лентивирусных векторов (LV) он ниже из-за особенностей их встраивания в геном [Laufs и др., 2006; Montini и др., 2006; Montini и др., 2009]. Их эффективность была показана, например, в мышинной модели хронического лимфолейкоза, когда доставка miR-15a и miR-16 лентивирусными векторами приводила к уменьшению численности злокачественных В-клеток и снижению активности заболевания [Kasar и др., 2012].

Еще один вариант транспортировки трансгенов предполагает использование аденовирусов, Ad (геном которых представлен двухцепочечной ДНК) и аденоассоциированных вирусов, AAV (геном которых представлен одноцепочечной ДНК), не имеющих липопротеидной оболочки [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. В отличие от упомянутых выше вирусов, они не обладают столь высокой патогенностью и могут доставлять терапевтическую конструкцию в целый ряд тканей [Daya, Berns, 2008]. Эти векторы способны эффективно доставлять трансгены как в покоящиеся, так и в делящиеся клетки, при этом не происходит встраивания их генетического материала в клеточный геном, что минимизирует риск инсерционного онкогенеза [Daya, Berns, 2008]. Говоря о «емкости» транспортной частицы отметим, что если для RV и LV она составляет около 8000 пар оснований переносимой ДНК, то для Ad-векторов это значение может достигать 38 000 пар оснований [Yang, 2015]. AAV-векторы могут переносить около 4800 пар оснований ДНК, что немного, в то же время их емкости достаточно для транспортировки микроРНК [Schultz, Chamberlain, 2008]. Эффективность данного подхода была показана, например, для доставки miR-196a в мышинной модели мышечной атрофии [Miyazaki и др., 2012] и miR-298 в других моделях нервно-мышечной патологии у мышей [Pourshafie и др., 2018]. Однако в моделях заболеваний более крупных животных и человека было выявлено развитие иммунной реакции на сам вектор, что может влиять на эффективность доставки и требует разработки новых модификаций транспортера [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Vandenberghe, Wilson, 2007; Wang и др., 2008].

Новый интересный подход, активно развивающийся в последние годы, предлагает отказ от вирусов эукариот в пользу бактериофагов, нагруженных микроРНК, и несущих в ряде случаев дополнительные поверхностные модификации для более эффективного таргетирования векторов

[Dasgupta, Chatterjee, 2021; Pan и др., 2012a]. Исследователи добились успеха в экспериментах по доставке микроРНК для лечения аутоиммунных заболеваний [Pan и др., 2012b], гепатоцеллюлярной карциномы [Wang и др., 2016b], заболеваний, связанных с вирусами Коксаки [Ye и др., 2011], для подавления остеокластогенеза [Yao и др., 2015]. В то же время эти исследования находятся пока на ранних стадиях, для решения вопроса о возможности использования фаговых векторов необходимы дополнительные оценки их безопасности, эффективности и возможности производства векторов в коммерческих объемах [Dasgupta, Chatterjee, 2021].

Успех систем доставки микроРНК на основе вирусов эукариот можно объяснить такими их характеристиками, как высокая эффективность трансдукции, широкий тропизм и длительная экспрессия трансгена, в связи с чем уже запущен ряд клинических испытаний с использованием вирусных векторов для генной терапии [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. Однако активность этих средств доставки часто ограничивается их высокой цитотоксичностью [Tripp, Mark Tompkins, 2014], канцерогенным потенциалом [Cooray, Howe, Thrasher, 2012] и иммуногенным потенциалом [Vannucci и др., 2013], их эффективная емкость тоже существенно ограничена [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Niccolini и др., 2022]. Фаговые векторы все еще требуют дополнительного изучения для оценки возможностей их использования в терапевтических целях. Преимущества и недостатки вирусных векторов как транспортеров обобщены в **Таблица 1-4**.

Таблица 1-4. Преимущества и недостатки систем доставки на основе вирусных частиц (по Dasgupta, Chatterjee, 2021).

Системы доставки	Преимущества	Недостатки
Ретровирусные векторы	Стабильная экспрессия трансгена	Высокий канцерогенный потенциал (инсерционный мутагенез) Отсутствие трансдукции в неделящиеся клетки
Лентивирусные векторы	Стабильная экспрессия трансгена Трансдукция в делящиеся и неделящиеся клетки	Риск инсерционного мутагенеза
Векторы на основе аденовирусов и аденоассоциированных вирусов	Низкая иммуногенность в ряде моделей Высокая способность к трансдукции в различные типы клеток	Невысокая «емкость» вектора Трудоемкое и дорогое производство

Системы доставки	Преимущества	Недостатки
	Направленная тканеспецифическая экспрессия генов в зависимости от серотипа используемого вектора	
Векторы на основе бактериофагов	Низкая иммуногенность, низкая цитотоксичность Низкий канцерогенный потенциал	Невысокая «емкость» вектора Требуются дополнительные исследования

1.3.2. Невирусные носители терапевтических олигонуклеотидов

Как было указано выше, несмотря на все свои достоинства вирусные векторы для доставки микроРНК имеют и ряд серьезных недостатков. В некоторой степени они могут быть устранены путем дополнительных модификаций транспортной частицы, однако привлекательным представляется и уход в сторону невирусных систем доставки нуклеиновых кислот. Менее токсичные и обладающие высокими показателями биосовместимости, эти транспортеры способны эффективно переносить микроРНК или микроРНК-экспрессирующие векторы внутрь клеток, защищая их от расщепления нуклеазами. В настоящее время основные подходы к созданию невирусных систем доставки связаны с использованием липидов, полимеров, неорганических частиц и внеклеточных везикул; принципиальные достоинства и недостатки этих вариантов приведены в Таблица 1-5.

Таблица 1-5. Преимущества и недостатки невирусных систем доставки (по Dasgupta, Chatterjee, 2021).

Системы доставки	Преимущества	Недостатки
Липидные частицы	Отсутствие иммуногенности Легкость в производстве Высокая биосовместимость	Относительно невысокая эффективность доставки Цитотоксический потенциал
Полимеры	Отсутствие иммуногенности Временная экспрессия транскгена Высокая «емкость» вектора	Невысокая эффективность доставки in vivo Цитотоксический потенциал
Векторы на основе неорганических частиц	Высокая «емкость» вектора Низкая цитотоксичность, низкая иммуногенность	Невысокая эффективность доставки

Системы доставки	Преимущества	Недостатки
Векторы на основе внеклеточных везикул	Высокая «емкость» вектора Отсутствие иммуногенности Тканеспецифичная доставка	Высокая стоимость производства Необходимость дальнейших исследований

1.3.2.1. Невирусные системы доставки: неорганические носители

Важным направлением разработки наноразмерных систем лекарственной доставки является использование твердых неорганических частиц из золота [Chen, Xianyu, Jiang, 2017], кремнезема (оксида кремния SiO_2) [Bitar и др., 2012], оксида железа Fe_3O_4 [Schade и др., 2013], диоксида титана TiO_2 [Li и др., 2020], а также различных производных углерода (углеродные нанотрубки, фуллерены, оксид графена) [Kutwin и др., 2021; Xu и др., 2022; Zare и др., 2021]. Как правило, нуклеиновые кислоты иммобилизуются на поверхности частицы с помощью ковалентно связываемых линкеров с тиоловыми группами или аминогруппами [Chen, Xianyu, Jiang, 2017], однако могут использоваться и другие способы, например, присоединение аптамеров [Esposito, Catuogno, Franciscis de, 2016].

Наночастицы золота характеризуются низкой цитотоксичностью и высокой эффективностью трансфекции (особенно при использовании адресующих лигандов), что, например, было показано в работе с доставкой miR-1 в опухолевые клетки [Ghosh и др., 2013] или с доставкой антагониста miR-155 для восстановления сердечной функции у мышей с диабетом [Jia и др., 2017].

Частицы кремнезема SiO_2 термостабильны и биосовместимы, а также имеют большую площадь поверхности, что позволяет им быть эффективными переносчиками микроРНК и их антагонистов [Mamaeva, Sahlgren, Lindén, 2013]. Также многообещающие результаты были показаны в работах с модифицированными частицами Fe_3O_4 [Sun и др., 2017].

Безусловным преимуществом твердых неорганических частиц является их инертность – высокая биосовместимость и низкая иммуногенность. В то же время эффективность доставки нуклеиновых кислот оказывается относительно невысокой [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. Кроме того, до сих пор остаются неясными аспекты их деградации и клиренса.

1.3.2.2. Невирусные системы доставки: липидные носители

Пожалуй, наиболее давно и наиболее широко используемыми наноносителями различных терапевтических субстанций являются частицы на основе липидов [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. С

1995 года, когда FDA одобрила липосомальную форму доксорубина (Doxil) для противоопухолевой терапии [Barenholz, 2012], данный метод лекарственной доставки претерпел множество изменений, но суть его остается прежней. Остановимся подробнее на вопросах использования катионных липидов, наиболее часто описываемых в работах, посвященных вопросам доставки нуклеиновых кислот.

Катионные липиды, формирующие транспортную липосому, образуют комплексы (липоплексы) с негативно заряженными нуклеиновыми кислотами; в дальнейшем эти липоплексы эффективно проникают в клетку в силу своего сродства к клеточной мембране [Hsu и др., 2013; Pedroso de Lima и др., 2001]. Кроме того, липидные носители обладают низкой иммуногенностью и просты в производстве [Dasgupta, Chatterjee, 2021].

В то же время в моделях *in vivo* катионные липосомы демонстрировали относительно низкую эффективность доставки микроРНК, вследствие активного их захвата фагоцитами [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Silva и др., 2014]. Для преодоления этих препятствий применяется ставший уже классическим метод ПЭГилирования (присоединения фрагментов ПЭГ, полиэтиленгликоля) липосом, позволяющий увеличить время циркуляции частиц [Silva и др., 2014]; так, например, в модели ишемии нижних конечностей использование ПЭГилированных липосом для доставки miR-126 приводило к улучшению кровотока и стимуляции ангиогенеза [Endo-Takahashi и др., 2015]. Помимо ПЭГ липосомы могут быть допированы и другими молекулами – холестерином, 1,2-ди-О-октадецен-3-метиламмонийпропаном (DOTMA, 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane), бромидом диметилоктадециламмония (DDAB, dimethyldioctadecyl ammonium bromide), витамином Е и другими липофильными компонентами [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. Данные конструкции обеспечивали успешную доставку некодирующих РНК – свободными или в сочетаниях с химиопрепаратами – в моделях немелкоклеточного рака легкого (miR-29b) [Wu и др., 2013], плоскоклеточного рака головы и шеи (pre-miR-107) [Piao и др., 2012], гепатоцеллюлярной карциномы (miR-101 + доксорубин) [Xu и др., 2017], меланомы (Bcl-2 siRNA + паклитаксел) [Reddy и др., 2016]. Катионные липоплексы, содержащие синтетический ингибитор miR-712 продемонстрировали свою эффективность в модели эндотелиального воспаления, связанного с атеросклерозом [Kheirloom и др., 2015].

Основным недостатком этих катионных липоплексов является их неспецифическое взаимодействие с нецелевыми белками, что приводит к их нестабильности и потенциально – к развитию нежелательных побочных эффектов. Проблема неспецифического/системного

накопления микроРНК в тканях может быть решена путем введения в комплексы компонентов, обеспечивающих специфичность доставки.

Наиболее часто для обеспечения адресной доставки в опухолевые клетки используются такие лиганды, как трансферрин и фолиевая кислота, однако более новые методы предполагают использование антител к матриксным металлопротеиназам (ММП), фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), молекулам адгезии (VCAM) и интегринам, а также аптамеров, которые специфично связывались бы с рецепторами на поверхности опухолевой клетки [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Wilner, Levy, 2016].

1.3.2.3. Невирусные системы доставки: внеклеточные везикулы

Идеологически близким к предыдущему варианту невирусной доставки терапевтических РНК в клетки могут выступать активно изучаемые в последние годы внеклеточные везикулы (extracellular vesicles, EV) – дериваты клеточных мембран, обеспечивающие транспорт белков, липидов, нуклеиновых кислот [Andaloussi EL и др., 2013]. В зависимости от пути происхождения они могут быть разделены на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Наличие на их поверхности маркера CD47 защищает EV от фагоцитарного клиренса, а возможности поверхностной модификации облегчает адресную доставку биомолекул к определенным тканям, что делает EV перспективными с точки зрения доставки терапевтических микроРНК [Jong de и др., 2019].

В экспериментальных работах при этом преимущество отдается экзосомам – пузырькам диаметром 40-120 нм, преимущественно производными поздних эндосом. Они зарекомендовали себя в качестве эффективных транспортеров микроРНК, обладающих низким цитотоксическим и антигенным потенциалом [Jong de и др., 2019; Munir, Yoon, Ryu, 2020; Simons, Raposo, 2009] в целом ряде моделей опухолевого [Li и др., 2019b; Wang и др., 2018] и неопухолевого генеза [Jiang и др., 2018; Li и др., 2019a; Luarte и др., 2020; Luo и др., 2017; Song и др., 2019; Wang и др., 2017]. В моделях инфаркта миокарда внутривенная инъекция экзосом, обогащенных miR-126, помогла уменьшить область повреждения сердца и степень выраженности фиброза [Wang и др., 2017]. Кроме того, miRNA-126-3p и 5p, успешно доставляемые экзосомами, полученными из эндотелиальных клеток-предшественников, помогают регулировать проницаемость сосудов при сепсисе, вызванном лигированием и пункцией слепой кишки (CLP) [Zhou и др., 2018]. В другом исследовании экзосомы, полученные из человеческих мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, обогащенные anti-miRNA-375, использовались для ограничения апоптоза во время трансплантации островков поджелудочной железы гуманизированным мышам [Wen и др., 2016]. Способность экзосом регулировать работу иммунокомпетентных клеток делает их

привлекательным инструментом для доставки микроРНК при аутоиммунных заболеваниях [Ortega и др., 2020a; Xu, Jia, Xu, 2019].

Микровезикулы и апоптотические тельца, другие представители группы EV, также могут выступать как транспортеры микроРНК. Так, сообщалось о микровезикулах, обогащенных miRNA-29a/c, которые были способны подавлять развитие опухоли при раке желудка [Zhang и др., 2016]. Апоптотические тельца эндотелиальных клеток, содержащие miR-126, индуцируют секрецию CXCL12, оказывая протективное воздействие в мышинной модели атеросклероза [Zernecke и др., 2009].

Учитывая все вышесказанное, EV выглядят практически идеальной системой доставки микроРНК: стабильной, биосовместимой, обладающей низкой иммуногенностью и высокой способностью к преодолению биологических барьеров в силу своей «естественной афинности» к клеткам и тканям [Ortega и др., 2020a]. В то же время открытыми остаются вопросы характеристики индивидуальных частиц и их стандартизации при производстве, условия хранения (в том числе, при производстве в коммерческих масштабах), а также определения их эффектов при различных путях введения. Таким образом, использование внеклеточных везикул пока остается целью для будущих разработок.

1.3.2.4. Невирусные системы доставки: полимеры

Пожалуй, самая многочисленная и гетерогенная по своим характеристикам группа невирусных систем доставки – это группа полимерных носителей.

Одним из наиболее распространенных полимеров, используемым для этой цели, выступает полиэтиленимин (PEI), существующий в линейной и разветвленной формах, чьи положительно заряженные аминогруппы образуют комплексы с РНК, защищая ее от деградации и обеспечивая ее захват клетками [Höbel, Aigner, 2013]. Как высоко-, так и низкомолекулярные разновидности PEI могут эффективно доставлять микроРНК в целевые клетки [Jäger и др., 2012], в то же время по мере увеличения молекулярной массы токсичность полимера возрастает [Labatut, Mattheolabakis, 2018]. Поэтому, несмотря на продемонстрированную эффективность доставки микроРНК с использованием PEI (например, в одной из работ доставка аналогов miR-33a и miR-145 мышам в модели ксенотрансплантата опухоли толстой кишки приводила к подавлению роста опухоли [Ibrahim и др., 2011]), относительно низкая эффективность трансфекции и высокая цитотоксичность делают PEI нежелательным выбором для терапевтической доставки нуклеиновых кислот. Возможным решением этой проблемы может стать модификация PEI за счет ковалентного связывания с ПЭГ или поли-L-лизином, что

способствует повышению показателей биосовместимости конструкции [Biray Avcı и др., 2013; Jäger и др., 2012].

Другим вариантом является использование полимеров с меньшими показателями цитотоксичности [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. Классическим примером является сополимер полимолочной и полигликолевой кислоты (полилактид-ко-полигликолид, PGLA) – одобренный FDA биоразлагаемый полиэфир, подходящий, например, для доставки синтетических ингибиторов микроРНК; чья гидрофобность, впрочем, существенно снижает эффективность доставки [Cheng, Saltzman, 2012]. Хитозан является еще одним примером биосовместимого природного полисахарида, и его галактозилированная форма может использоваться для доставки предшественника микроРНК-16 в макрофаги толстой кишки мыши [Gao и др., 2003; Gao и др., 2005; Martirosyan, Olesen, Howard, 2014].

Таким образом, несмотря на изобилие вариантов, предлагаемых для решения проблем доставки терапевтических нуклеиновых кислот, на пути возможного широкого применения невирусных частиц встречаются множественные препятствия. Твердые наночастицы обладают низкой иммуногенностью, но эффективность доставки невелика, а вопросы биодоступности, деградации и клиренса частиц по-прежнему требуют тщательного исследования. «Естественные» нанотранспортеры – внеклеточные везикулы – обладают высокой гетерогенностью, что затрудняет их продукцию и характеризацию [Dasgupta, Chatterjee, 2021; Niccolini и др., 2022]. Мягкие наночастицы различных видов считаются одним из наиболее широко используемых способов доставки, они, как правило, обладают меньшей иммуногенностью и высокой емкостью, являются простыми в изготовлении материалами, но в то же время их использование может иметь недостатки, связанные с цитотоксическими эффектами или низкой эффективностью трансфекции [Ban, Kwon, Kim, 2019; Dasgupta, Chatterjee, 2021; Scheideler, Vidakovic, Prassl, 2020]. Таким образом, актуальным представляется поиск новых молекул, которые эффективно доставляли бы терапевтические компоненты в целевые ткани и клетки, обладая при этом высоким профилем биосовместимости. При этом их получение должно быть относительно простым и масштабируемым для последующего коммерческого применения. Такими свойствами может обладать новый класс полимерных молекул – дендримеры, свойства которых мы рассмотрим в следующей главе.

1.4. Дендримеры как новая платформа для создания терапевтических систем.

1.4.1. Дендримеры: структура и свойства.

Дендримеры – это общее название большого семейства высокосимметричных гиперразветвленных молекул различного химического происхождения [Caminade, 2020]. Они состоят из центральной коровой части (“core”) и множественных «ветвей», исходящих из центра и имеющих несколько точек бифуркации; при этом количество точек бифуркации одинаково на всех «ветвях», оно определяет поколение дендримера [Caminade, 2020; Ihnatsyeyu-Kachan и др., 2017] (см **Рисунок 1-3**). Изолированная ветвь с центральным атомом называется дендроном, дендроны также способны выступать носителями лекарственных субстанций, однако их поведение описывается несколько другими принципами.

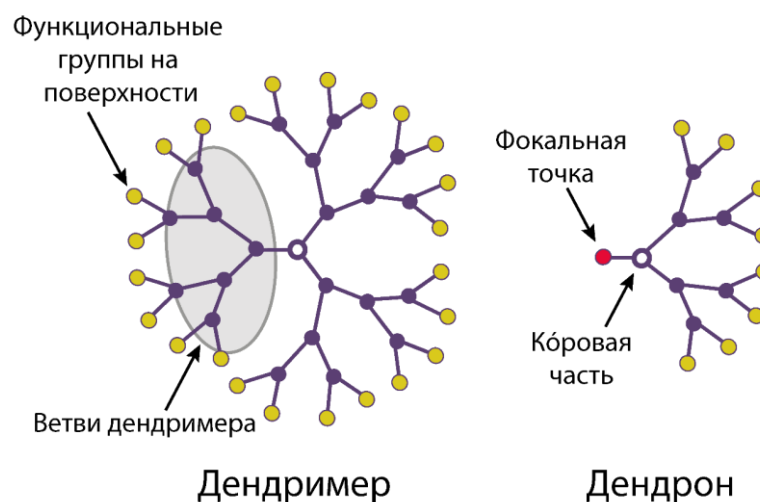


Рисунок 1-3. Общая структура дендримера и дендрона.

Характеристики дендримеров и особенности их получения позволяют вводить в структуру необходимые функциональные группы, добиваясь заданных химических свойств [Cramer, Adjei, Labhasetwar, 2015; Labatut, Mattheolabakis, 2018].

По сравнению с описанными выше полимерными носителями синтез дендримеров хорошо контролируется на каждом этапе и может проводиться в больших объемах, а получающиеся продукты реакции монодисперсны – имеют заданный размер и молекулярную массу, что оказывается чрезвычайно важным при коммерческом производстве субстанции для реальной терапевтической практики [Lazniewska и др., 2013]. В зависимости от поверхностного заряда можно выделить группу катионных (положительный заряд), анионных (отрицательный заряд) и нейтральных дендримеров.

Исторически первыми исследовались свойства анионных дендримеров. Они продемонстрировали ряд иммуномодулирующих свойств, связанных, в частности, с подавлением воспаления [Hayder и др., 2011a], в то же время, из-за того, что клеточные мембраны имеют отрицательный заряд, анионные носители, по-видимому, не проникают внутрь клеток, что ограничивает область их использования.

Для задач транспорта нуклеиновых кислот большой интерес представляют катионные дендримеры – их поверхностные положительно заряженные функциональные группы позволяют нековалентно связывать фрагменты нуклеиновых кислот, формируя дендриплексы, чьи характеристики при этом могут зависеть от соотношения зарядов в системе дендример/нуклеиновая кислота [Dzmitruk и др., 2015; Fornaguera и др., 2015; Ihnatsyeu-Kachan и др., 2017; Ionov и др., 2015; Krasheninina и др., 2019; Lazniewska и др., 2013; Posadas и др., 2009]. С другой стороны, следует отметить, что эти молекулы обладают собственным токсическим действием уже в средних концентрациях [Białkowska и др., 2021; Lazniewska и др., 2013]. Предполагается, что цитотоксичность зависит не только от химического происхождения молекулы, но и от поколения и молекулярной массы, что характерно для всех подобных полимеров [Labatut, Mattheolabakis, 2018]. Однако дендримеры более старших поколений обычно обладают большей проникающей активностью [Krasheninina и др., 2019], поэтому необходимо найти баланс между биосовместимостью и транспортной эффективностью.

Одними из первых в этом ряду были разработаны полиамидоаминовые дендримеры (PAMAM), одобренные в настоящее время для коммерческого использования. Ранее они продемонстрировали свою эффективность для доставки терапевтических олигонуклеотидов в опухолевых и неопухолевых моделях [Sherje и др., 2018; Wang и др., 2016a; Wu и др., 2018]. В то же время их использование связано с рядом ограничений [Chis и др., 2020; Labieniec-Watala, Watala, 2015]: в первую очередь, PAMAM-дендримеры обладают собственной токсичностью, кроме того, они относительно нестабильны при хранении – «ветви» могут отделяться от кора или складываться, «атакуя» кор (back folding effect), что приводит к распаду молекулы [Lee, Baker, Larson, 2006].

В связи с этим большой интерес представляет изучение катионных дендримеров иной химической природы – фосфорных, содержащих атомы фосфора в ядре и точках разветвления, или карбосилановых, имеющих в указанных точках атомы кремния [Caminade, 2020]; о них мы и будем говорить в дальнейшем. Указанные классы дендримеров стабильны при хранении; к настоящему моменту накоплены данные, описывающие активность дендримеров как носителей терапевтических субстанций, так и в качестве самостоятельных лекарственных агентов.

1.4.2. Дендримеры и их собственная терапевтическая активность

Одной из первых областей исследования биологических свойств катионных фосфорных дендримеров стало изучение их активности в отношении нейродегенеративных заболеваний различной природы [Caminade, 2017]. Так, один из представителей семейства, фосфорный дендример 4 поколения, проявлял антиприонную активность в моделях прион-ассоциированных трансмиссивных губчатых энцефалопатий: было выявлено снижение уровня прионных частиц, снижение передачи частиц от инфицированных клеток, уменьшение накопления прионов в селезенке [Solassol и др., 2004]. Дендример замедлял формирование пептидных агрегатов и уменьшал формирование амилоидных фибрилл [Klajnert и др., 2007]. Сходные эффекты были показаны в модели болезни Альцгеймера: фосфорные дендримеры 3 и 4 поколения оказывали влияние на агрегацию бета-амилоида и тау-белка, ингибировали активность ацетилхолинэстеразы и снижали секрецию TNF α , обладали слабым антиоксидантным действием [Wasiak и др., 2012].

Также известно о токсическом эффекте фосфорных дендримеров по отношению к опухолевым клеткам, в то же время эти данные получены в основном в исследованиях с использованием модифицированных фосфорных дендримеров или их комплексов с противоопухолевыми субстанциями [Caminade, 2017]. Собственная противоопухолевая активность молекул обычно оказывалась вне фокуса внимания исследователей, схожая проблема существует и в отношении данных о собственных токсических эффектах карбосилановых дендримеров [Białkowska и др., 2021].

Данных, описывающих взаимодействие фосфорных дендримеров с иммунокомпетентными клетками немного, и они касаются, в основном, анионных молекул. Так, известно, что интернализация анионных дендримеров в моноциты человека происходит очень быстро (менее 1 минуты) [Rouprot и др., 2006] и влечет за собой индукцию противовоспалительных изменений в клетках – описано усиление секреции IL-10 и снижение продукции IL-12, TNF α , IL-6 [Degboé и др., 2014], повышение экспрессии ряда генов, вовлеченных в развитие противовоспалительных реакций [Fruchon и др., 2009]. Внесение фосфорных дендримеров в клеточную культуру в процессе получения дендритных клеток моноцитарного происхождения приводило к индукции толерогенного фенотипа ДК – наблюдалось снижение экспрессии молекул CD80 и CD86 на их поверхности [Degboé и др., 2014]. Противовоспалительная активность анионных фосфорных дендримеров была показана в модели артрита у мышей, их использование подавляло активность остеокластов, клинически при этом было описано отсутствие или уменьшение деструкции хрящевой и костной ткани, снижение

выраженности отека и восстановление функциональной активности конечности [Caminade, 2017; Hayder и др., 2011b].

В отношении катионных карбосилановых дендримеров данные об их биологических свойствах ограничены и разрознены. При оценке биосовместимости карбосилановых дендримеров показана их относительно низкая токсичность по отношению к МНК ПК условно здоровых доноров, однако эти данные были получены лишь для узкого диапазона структур; в то же время было подтверждено более раннее наблюдение – токсичность дендримеров возрастает с поколением [Bermejo и др., 2007]. Также при этом отмечалось, что использование карбосилановых дендримеров не приводило к значимому возрастанию пролиферации лимфоцитов (по сравнению с ФГА) [Bermejo и др., 2007]. В то же время карбосилановые дендримеры проявляют дозозависимый токсический эффект по отношению к опухолевым клеткам [Białkowska и др., 2021].

Одна из потенциальных сфер применения катионных карбосилановых дендримеров связана с их антибактериальной активностью, продемонстрированной в отношении *S.aureus*, *E.coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [Ortega и др., 2020b; Rasines и др., 2009]; антипротозойной активностью в отношении трофозоитов и цист *Acanthamoeba* spp [Heredero-Bermejo и др., 2015; Heredero-Bermejo и др., 2016; Heredero-Bermejo и др., 2020].

Данные о влиянии карбосилановых дендримеров на регуляцию иммунного ответа ограничены. Было показано, что внесение карбосилановых дендримеров 2G-NN16 в культуру CD8⁺ Т-лимфоцитов приводило к снижению экспрессии IL-21, CXCR6 и GRP15, отмечалось снижение способности CD8⁺ Т-клеток дифференцироваться в про-воспалительные Tc17-лимфоциты, при этом не было выявлено значимого токсического эффекта в отношении CD8⁺ Т-лимфоцитов [Gras и др., 2012a]. В культуре CD4⁺ Т-клеток эти дендримеры приводили к подавлению экспрессии генов, связанных с Th17-дифференцировкой, снижению продукции IL-17A [Gras и др., 2012b]; сходный эффект – выраженное снижение экспрессии IL-17F, IL-23A, IL-23R – наблюдалось и в работах с макрофагами человека [Gras и др., 2009].

Эти данные представляют большой интерес для оценки возможных эффектов дендримеров на иммунную систему при использовании их в терапевтических целях.

1.4.3. Катионные дендримеры как носители терапевтических нуклеиновых кислот

Как уже отмечалось выше, катионные дендримеры являются перспективными носителями отрицательно заряженных терапевтических нуклеиновых кислот как в опухолевые, так и в иммунокомпетентные клетки.

Карбосилановые дендримеры эффективно доставляли флюоресцентно меченные нуклеиновые кислоты – антисмысловые последовательности к мРНК ВИЧ [Bermejo и др., 2007; Pedziwiatr-Werbicka и др., 2012] в МНК ПК и опухолевые Т-клеточные линии человека, при этом было показано также, что дендримеры значительно уменьшают связывание олигонуклеотидов с альбумином сыворотки [Pedziwiatr-Werbicka и др., 2012]. Использование комплексов фосфорных и карбосилановых дендримеров с микроРНК позволяло добиться супрессии Nef-белка ВИЧ и снижения репликации ВИЧ в Т-клетках линии SupT1 и культуре первичных МНК ПК [Bermejo и др., 2007; las Cuevas de и др., 2012; Pedziwiatr-Werbicka и др., 2012; Vacas-Córdoba и др., 2014]. Катионные карбосилановые дендримеры в комплексе с siRNA, подавляющими продукцию белков ВИЧ gag и p24, успешно проникали в человеческие астроциты (не оказывая значимого токсического воздействия) и подавляли репликацию вируса [Jiménez и др., 2010; Serramía и др., 2015].

Активность подобных комплексов была показана и в других моделях: модифицированные фосфорные дендримеры успешно доставляли анти-TNF α siRNA в модели острого повреждения легких у мышей, оказывая противовоспалительное действие; аналогичным образом наблюдалось подавление продукции TNF α ЛПС-активированными макрофагами мыши [Bohr и др., 2017]. Интересно, что по некоторым данным фосфорные дендримеры могут оказаться более подходящими для доставки малых некодирующих РНК, чем РАМAM-дендримеры [Dzmitruk и др., 2015].

Использование карбосилановых дендримеров позволило эффективно доставить проапоптотические siRNA Mcl-1 и Bcl-2 в опухолевые клетки линии MCF-7, дендриплексы при этом достоверно снижали жизнеспособность клеток [Białkowska и др., 2021]. Сходные результаты были получены при использовании других опухолевых линий человека – линии рака шейки матки HeLa и линии промиелоцитарной лейкемии HL-60 [Krasheninina и др., 2019]. Фосфорные дендримеры успешно использовались для доставки про-апоптотических siRNA в клеточные линии трижды-негативного рака молочной железы, ДНК-плазмид, экспрессирующих белок p53 в клетки линии HeLa [Caminade, 2020].

Важно отметить, что большая часть имеющихся данных, описывающих активность комплексов дендримеров с терапевтическими олигонуклеотидами, получена в моделях опухолевых или воспалительных заболеваний – патологических состояний, облегчающих захват наночастиц [Bentley, Little, 2021; Boosz и др., 2021; Dasgupta, Chatterjee, 2021; Kheirrolomoom и др., 2015; Sanz-Ortega, Rojas, Barber, 2020]. Так, например, замедленный кровоток в сосудах опухолей и повышенная их проницаемость способствуют пассивному накоплению наночастиц в

опухолевой ткани (т.н. EPR-effect, enhanced permeability and retention) [Lynn, Laga, Jewell, 2019]. Однако, если мы переходим к моделям иммунокомпетентных клеток, и, в особенности, Т-клеток, параметры захвата будут очень зависеть от субпопуляции и от функциональной активности клеток. В то же время, именно нацеливание на клетки, обеспечивающие адаптивный и/или врожденный иммунитет (в отличие от избегания взаимодействия наночастиц с иммунокомпетентными клетками), может быть действительно перспективным подходом для нужд современной иммунотерапии [Keshavan и др., 2019; Teunissen и др., 2021].

2. Материалы и методы

2.1. Общая информация об исследовании

2.1.1. Объект и предмет исследования.

Объектами исследования являлись

- Катионные дендримеры 3 поколения AE2G3 (фосфорный дендример) и BDEF33 (карбосилановый дендример) и их комплексы с микроРНК;
- Синтетические аналоги микроРНК miR-155, miR-34;
- Синтетические ингибиторы микроРНК miR-155 (amiR-155), miR-21 (amiR-21), имеющие метильную группу по 2'-положению рибозы;
- моноклеарные клетки периферической крови условно здоровых доноров, а также клетки опухолевых линий лейкемии и глиобластомы.

Характеристика донорской группы приведена ниже, данные указаны согласно экспериментам, для которых проводился набор подгрупп.

Таблица 2-1. Распределение демографических характеристик доноров МНК ПК по этапам экспериментальной работы

	N	Соотношение М:Ж	Возраст (Mean \pm SD)
Оценка жизнеспособности клеток (WST assay) при обработке:			
AE2G3	6	3:3	25.7 \pm 1.6
AE2G3/miR	5	3:2	25.0 \pm 0.0
BDEF33	5	1:4	37.2 \pm 13.0
BDEF33/miR	8	3:5	25.3 \pm 1.7
Оценка параметров апоптоза (все исследуемые молекулы и их комплексы)	6	2:4	29.0 \pm 7.5
Оценка активности ЛДГ (все исследуемые молекулы и их комплексы)	5	2:3	41.6 \pm 21.5
Оценка параметров интернализации комплексов дендримеров и микроРНК	6	3:3	31.7 \pm 9.9
Оценка параметров клеточной пролиферации (CFSE-assay) и экспрессии маркеров активации (все исследуемые молекулы и их комплексы)	6	2:4	38.5 \pm 20.9
Оценка продукции перфорины и гранзима В (все исследуемые молекулы и их комплексы)	6	2:4	27.5 \pm 7.0
Оценка продукции цитокинов в культуре МНК ПК (все исследуемые молекулы и их комплексы)	5	1:4	41.2 \pm 21.9

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.

Также в работе использовались следующие линии клеток.

- 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.

Исследуемые культуры различаются по своим молекулярно-биологическим характеристикам, относясь к разным подтипам глиобластомы (см **Таблица 2-2**, **Таблица 2-3**).

Таблица 2-2. Характеризация молекулярных подтипов глиобластомы (по Verhaak и др., 2010; Zhang и др., 2020b)

	Пронеуральный тип	Нейральный тип	Классический тип	Мезенхимальный тип
Молекулярная "подпись"	PDGFRA, OLIG2, DDL3, SOX2, NKX2-2	MBP/MAL, NEFL, SLC12A5, SYT1, GABRA1	EGFR, AKT2, SMO, GAS1, GLI2, NOTCH3, JAG1, LFNG	YKL40, MET, CD44, MERTYK, TRADD, RELB, TNFRSF1A
Мутантные гены	TP53, PI3K, IDH1, PDGFRA		PTEN, CHKN2, PDGFRA	NF-κB, NF1

Таблица 2-3. Характеристика линий опухолевых стволовых клеток глиобластомы, используемых в исследовании (по Heunckes и др., 2019)

Клеточная линия	Пол донора клеток	Молекулярный подтип	Статус метилирования гена MGMT	IDH-тип	Экспрессия ALDH1A3
BTSC233	женский	мезенхимальный	метилован	дикий тип	+
JHH520	женский	мезенхимальный	метилован	дикий тип	+
NCH644	женский	пронеуральный	метилован	дикий тип	-
GBM1	мужской	классический	метилован	дикий тип	+

Все образцы донорской крови были получены после получения добровольного информированного согласия и после одобрения локальным этическим комитетом НИИФКИ.

Этическое разрешение на проведение исследований *in vitro* на моделях опухолей было получено комиссией по этике медицинского факультета Университета Генриха Гейне, Дюссельдорф, Германия.

2.2. Общая схема эксперимента

2.2.1. Исследование иммуномодулирующих свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК в модели МНК ПК условно здоровых доноров.

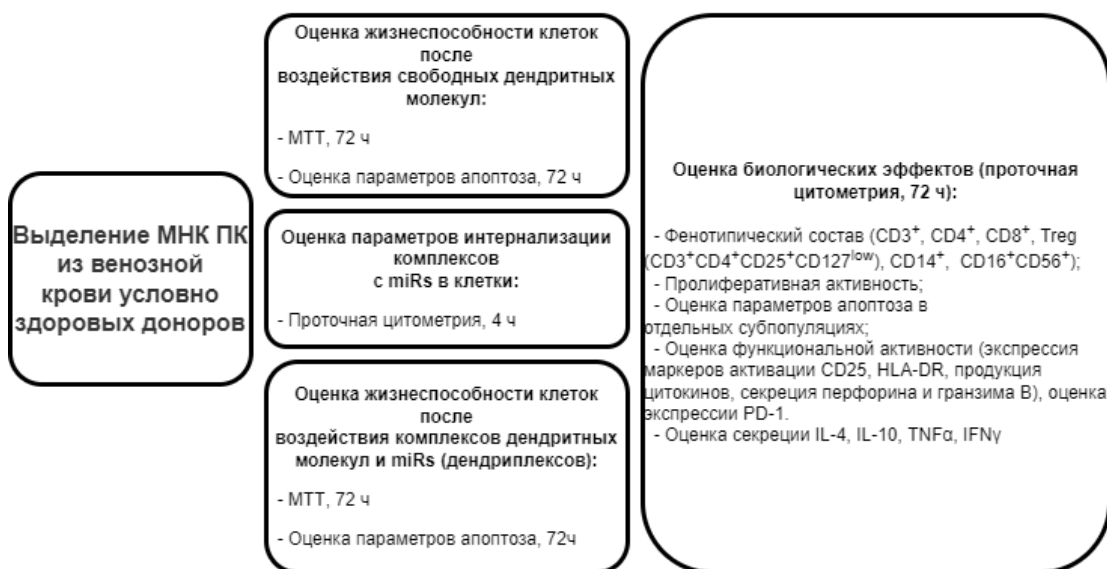


Рисунок 2-1. Общая схема экспериментальной работы по исследованию свойств катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК по отношению к МНК ПК условно здоровых доноров.

2.2.2. Исследование противоопухолевых свойств катионных дендритных молекул и их комплексов с микроРНК в моделях глиобластомы и лейкемии

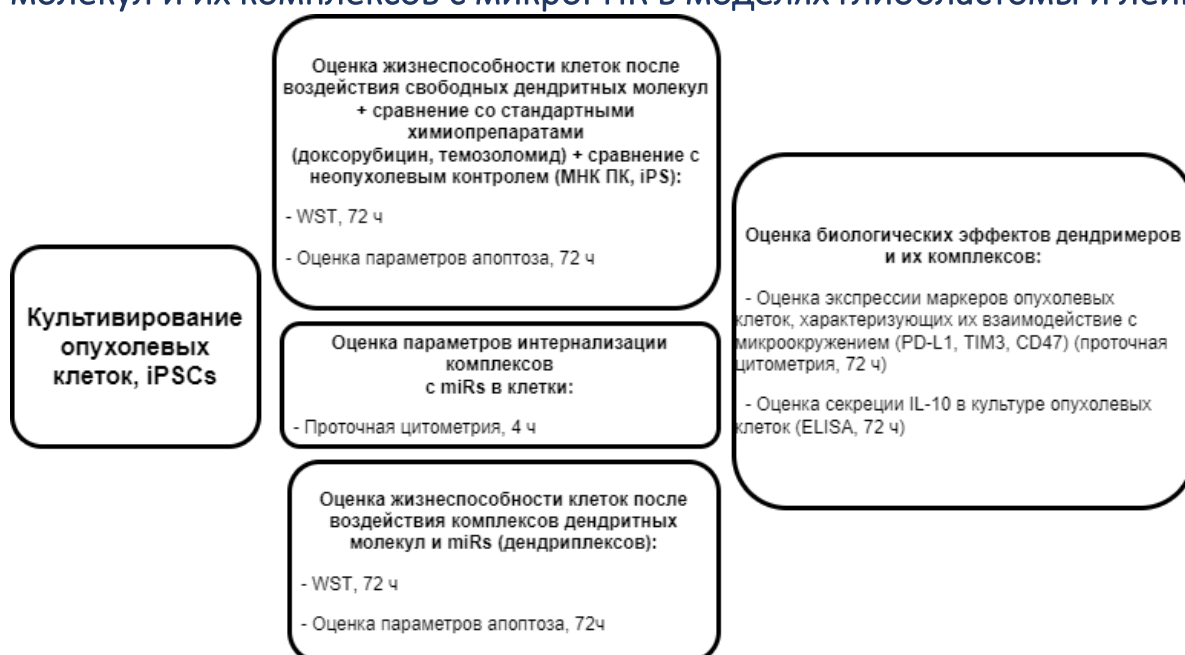


Рисунок 2-2. Общая схема экспериментальной работы по исследованию свойств катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК по отношению к опухолевым клеткам.

2.3. Описание экспериментальных методик

2.3.1. Реагенты, растворы и расходные материалы, использованные в исследовании

B27, культуральная добавка	Thermo Fisher Scientific, США
CFSE, Carboxyfluorescein succinimidyl ester	Molecular probe, США; Invitrogen, США
Cytofix, фиксирующий буфер	BD Biosciences, США
Cytoperm, фиксирующий буфер	BD Biosciences, США
DMEM, культуральная среда (высокое содержание глюкозы, без пирувата)	Thermo Fisher Scientific, США
EDTA, этилендиаминтетрауксусная кислота	MP Biomedicals, Германия; Sigma Aldrich, США
EGF, эпидермальный фактор роста	Peprtech, США
F-12, культуральная добавка	Thermo Fisher Scientific, США
FCS, фетальная бычья сыворотка	FCS HyClone, Великобритания; Thermo Fisher Scientific, США
FGF, фактор роста фибробластов	Peprtech, США

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	BioLegend, США
HCl, соляная кислота	Roth, Германия
Human IL-10 ELISA MAX Deluxe kit	Biolegend, США
LDH Assay Kit Colorimetric	Abcam, США
Lipofectamine 3000	Invitrogen, США
L-глутамин	ФГУП ГНЦ ВБ Вектор, Россия
mTeSR, культуральная среда	Stemcell Technologies, Франция
МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид	Sigma Aldrich, США
Muse® Annexin V & Dead Cell Kit	Luminex, Бельгия
PBS, фосфатно-солевой буфер	Росмедбио, Россия; Thermo Fisher Scientific, США
PFA, параформальдегид	Sigma Aldrich, США
RPMI-1640, культуральная среда	ФГУП ГНЦ ВБ Вектор, Россия; ПанЭко, Россия; Gibco, США
Triton X-100	Sigma Aldrich, США
Vacutette, вакуумные пробирки, тип наполнителя - Li-гепарин, Na-гепарин	Greiner Bio-One GmbH, Австрия
WST-1, Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System	Takara Bio, Япония
Витронектин	Gibco, США
Гентамицин	Дальхимфарм, Россия
Гепарин	Sigma Aldrich, США
Глицин	Sigma Aldrich, США
ДМСО, диметилсульфоксид	Riedel-deHaën, Германия
Изопропанол	VWR, США
MAT Annexin V-Pacific Blue, моноклональные антитела мыши к аннексину V (человек)	Biolegend, США
MAT CD127-PerCP/Cy 5.5, моноклональные антитела мыши к CD127 (человек)	Biolegend, США
MAT CD14-PE/Cy7, моноклональные антитела мыши к CD14 (человек)	Biolegend, США
MAT CD16-PerCP, моноклональные антитела мыши к CD16 (человек)	Biolegend, США
MAT CD19-APC, моноклональные антитела мыши к CD19 (человек)	Biolegend, США
MAT CD25-APC, моноклональные антитела мыши к CD25 (человек)	Biolegend, США

MAT CD25-PE, моноклональные антитела мыши к CD25 (человек)	Biolegend, США
MAT CD3-PerCP, моноклональные антитела мыши к CD3 (человек)	Biolegend, США
MAT CD3-PE/Cy7, моноклональные антитела мыши к CD3 (человек)	Biolegend, США
MAT CD45-APC/Cy7, моноклональные антитела мыши к CD45 (человек)	Biolegend, США
MAT CD47-APC, моноклональные антитела мыши к CD47 (человек)	BD Biosciences, США
MAT CD4-APC, моноклональные антитела мыши к CD4 (человек)	Biolegend, США
MAT CD4-APC/Cy7, моноклональные антитела мыши к CD4 (человек)	Biolegend, США
MAT CD56-PE/Cy7, моноклональные антитела мыши к CD56 (человек)	Biolegend, США
MAT CD8-PE/Cy7, моноклональные антитела мыши к CD8 (человек)	Biolegend, США
MAT granzyme B-PE, моноклональные антитела мыши к гранзиму В (человек)	Biolegend, США
MAT HLA-DR-APC/Cy7, моноклональные антитела мыши к HLA-DR (человек)	Biolegend, США
MAT PD-1-FITC, моноклональные антитела мыши к PD-1 (человек)	Biolegend, США
MAT PD-L1-PE, моноклональные антитела мыши к PD-L1 (человек)	Biolegend, США
MAT perforin-FITC, моноклональные антитела мыши к перфोरину (человек)	Biolegend, США
MAT TIM-3-FITC, моноклональные антитела мыши к TIM-3 (человек)	Biolegend, США
Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови.	Вектор-БЕСТ, Россия
Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-10 в сыворотке крови.	Вектор-БЕСТ, Россия
Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-4 в сыворотке крови.	Вектор-БЕСТ, Россия
Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей - альфа в сыворотке крови.	Вектор-БЕСТ, Россия

Пенициллин/стрептомицин	Sigma Aldrich, США
Темозоломид	Sigma Aldrich, США
Тиенам	Merck Sharp & Dohme, Нидерланды
Урографин	Schering AG, Германия
Фиколл	Pharmacia Fine Chemical, Швеция

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

Дендримеры были предоставлены к.х.н. Е.К. Апарциным (ЛХРНК ИХБФМ, Новосибирск, Россия; Лаборатория координационной химии CNRS, Тулуза, Франция), профессором Р.С. Гомесом (Университет Алькала, Алькала-де-Энарес, Мадрид, Испания). микроРНК были предоставлены к.х.н. М. И. Мещаниновой (ЛХРНК ИХБФМ, Новосибирск, Россия).

В работе использовали катионный фосфорный дендример 3 поколения AE2G3 и катионный карбосилановый дендример 3 поколения BDEF33.

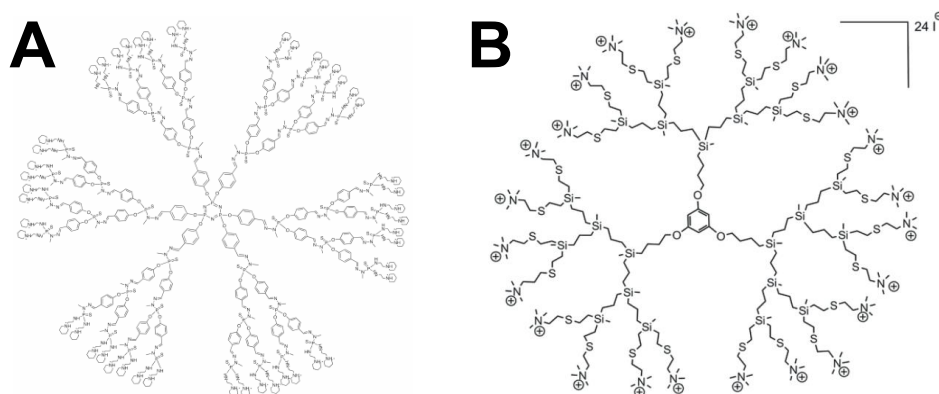


Рисунок 2-3. Структуры катионного фосфорного дендримера 3 поколения AE2G3 (A) и катионного карбосиланового дендримера 3 поколения BDEF33 (B)

Последовательности использованных олигонуклеотидов приведены в **Таблица 2-4**. Синтетические ингибиторы микроРНК (anti-miR) имели метильную группу по 2'-положению рибозы:

Таблица 2-4. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

miR-155-5p	5'-r(UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU)
anti-miR-155-5p	5'-m(ACCCCUAUCACGAUUAGCAUUA)

miR-34a	5'-r(UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU)
amiR-21	5'-m(UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA)

Для получения стоковых растворов дендримеры растворяли в сверхчистой воде (milli-Q) до финальной концентрации 1 ммоль/л, полученные растворы хранили при температуре +4°C. Олигонуклеотиды растворяли в сверхчистой воде (milli-Q) до финальной концентрации 20 ммоль/л, хранили при температуре -20°C. Темозоломид (TMZ) растворяли в ДМСО до финальной концентрации 20 ммоль/л, хранили при температуре -20°C. Доксорубин (Dox) растворяли в сверхчистой воде (milli-Q) до финальной концентрации 1 ммоль/л, хранили при температуре -20°C.

Для приготовления растворов дендриплексов растворы олигонуклеотидов смешивали в соответствии с рассчитанными ранее оптимальными зарядовыми соотношениями [Ihnatsyey-Kachan и др., 2017], финальные концентрации РНК составляли 25 нмоль/л, 50 нмоль/л, 100 нмоль/л, 150 нмоль/л (см **Таблица 2-5**). Комплексы инкубировали в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре и использовали для последующих работ (дендриплексы для каждого эксперимента готовили de novo).

В качестве контрольного носителя нуклеиновых кислот использовали Lipofectamine 3000 (Lipo), комплексы с нуклеиновыми кислотами готовили в соответствии с рекомендациями производителя.

Таблица 2-5. Концентрации РНК и катионных дендримеров, используемых для получения дендриплексов

Концентрация микроРНК, нмоль/л	Зарядовое соотношение	Концентрация AE2G3, мкмоль/л	Концентрация BDEF33, мкмоль/л
25	10	0.11	0.22
50	10	0.22	0.44
100	10	0.44	0.88
150	10	0.66	1.31

2.3.3. Выделение моноклеарных 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.

Выделение МНК ПК проводили по общепринятой методике [Böyum, 1968], предполагающей центрифугирование цельной гепаринизированной крови в градиенте плотности фиколл-урографина. Для этого объем крови разводили в 2 раза фосфатно-солевым буфером PBS с 0,02% EDTA, перемешивали и наслаивали примерно по 10 мл на 3 мл фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г/л). Далее центрифугировали при 2500 об/мин в течение 25 мин.

Сформировавшееся интерфазное кольцо МНК ПК аккуратно собирали, переносили в отдельную пробирку и дважды отмывали PBS, ресуспендируя клетки в буфере и центрифугируя затем при 1500 об/мин в течение 5 минут с последующим удалением надосадочной жидкости.

Клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 0,3 мг/мл L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина и 25 мкг/мл тиенама, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FCS. При проведении окрашивания клеток CFSE (См. **Раздел 2.3.5**) клеточный осадок ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI-1640.

Подсчет выделенных клеток проводился по стандартной методике в камере Горяева.

2.3.4. Культивирование клеток *in vitro*

МНК ПК, клетки линии Jurkat: Мононуклеарные клетки периферической крови человека и опухолевые клетки лейкемии человека культивировались в клеточной среде RPMI-1640, содержащей 0,3 мг/мл L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина и 25 мкг/мл тиенама, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FCS (полная среда RPMI-1640). Клеточная суспензия представляла собой множественные единичные клетки либо их агрегаты (см **Рисунок 2-4**). Клетки культивировали в стандартных пластиковых плоскодонных планшетах в присутствии исследуемых молекул и комплексов в течение 72 ч.

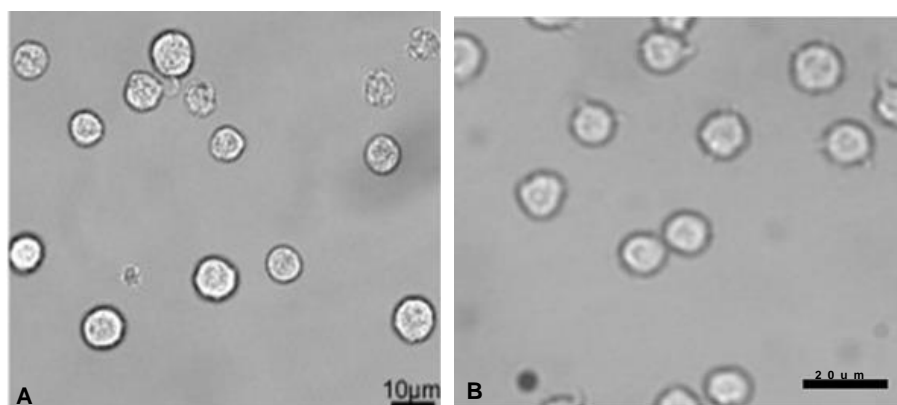


Рисунок 2-4. Микрофотографии культур (А) МНК ПК (по Sauter и др., 2013) и (В) Jurkat (по Onnekink и др., 2020)

Клетки линий глиобластомы (U87) и опухолевых стволовых клеток глиобластомы (BTSC233, JHH520, NCH644, GBM1): Для культивирования данных клеток использовалась бессывороточная среда DMEM/F-12 (для получения 500 мл среды использовали 340 мл среды DMEM с высоким содержанием глюкозы, без пирувата; 145 мл среды F-12; 10 мл добавки B27; по 500 мкл растворов EGF, FGF и гепарина и 5 мл смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин(финальная концентрация 100 мкг/мл)). В данной среде клетки формируют особые трехмерные структуры, называемые нейросферами (см **Рисунок 2-5**), поэтому каждый пассаж требовал аккуратно пипетирования клеток для получения единичных клеток в суспензии. Клетки культивировали в стандартных пластиковых плоскодонных планшетах в присутствии исследуемых молекул и комплексов в течение 72 ч.

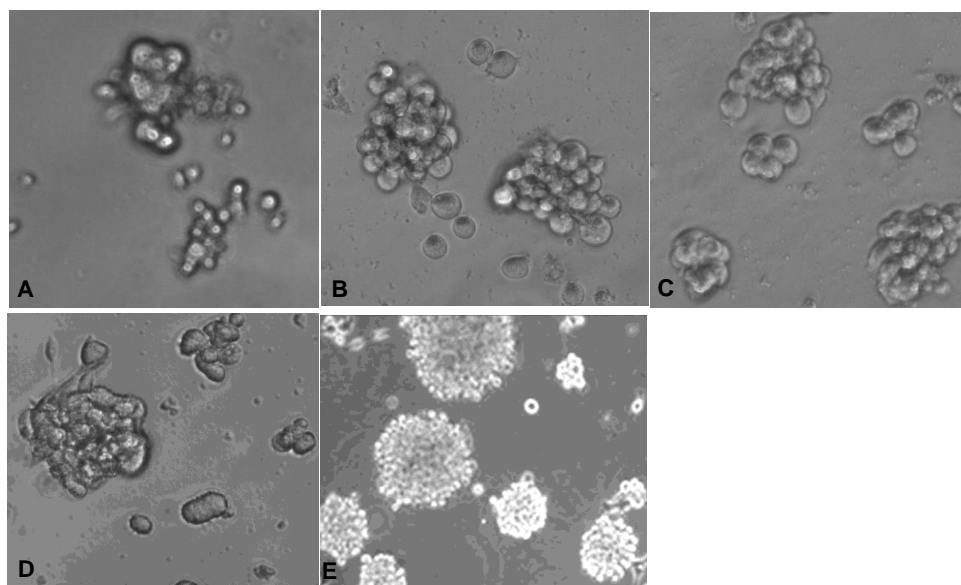


Рисунок 2-5. Микрофотографии культур опухолевых стволовых клеток глиобластомы (A) BTSC233; (B) JHH520; (C) NCH644; (D) GBM1 (200-кратное увеличение). Для сравнения была использована культура глиобластомы человека U87 (E) (изображение приведено по Annabi и др., 2009, 200-кратное увеличение).

iPSCs: индуцированные плюрипотентные клетки человека представляют собой адгезивную культуру, растущую в бессывороточной среде mTeSR (без добавления антибиотиков). Для обеспечения адгезивного роста дно планшетов покрывали раствором витронектина: в каждую лунку вносили 1 мл раствора витронектина в PBS (60 мкл витронектина в 6 мл PBS), инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на планшетном шейкере. Подготовленные планшеты могли храниться в стерильных условиях при температуре +4°C. Клетки выращивали в плоскодонных планшетах в присутствии исследуемых молекул и комплексов в течение 72 ч, максимальный показатель конфлюэнтного роста не превышал 70-80%, для отделения клеток от планшета использовали 0,5 ммоль/л раствор EDTA в PBS.

В Таблица 2-6 приведены диапазоны концентраций исследуемых молекул и их комплексов:

Таблица 2-6. Диапазон концентраций исследуемых молекул и их комплексов

	AE2G3, BDEF33, мкмоль/л	AE2G3/miR, BDEF33/miR, Lipo/miR, нмоль/л в эквиваленте РНК	TMZ	Dox
МНК ПК	0 мкмоль/л 0,3 мкмоль/л 1 мкмоль/л 3 мкмоль/л 10 мкмоль/л 30 мкмоль/л	25 нмоль/л 50 нмоль/л 100 нмоль/л 150 нмоль/л	-	-
Опухолевые клетки, iPSCs	0 мкмоль/л 0,1 мкмоль/л 1 мкмоль/л 10 мкмоль/л 100 мкмоль/л		0 мкмоль/л 0,1 мкмоль/л 1 мкмоль/л 10 мкмоль/л 100 мкмоль/л (модель глиобластомы)	0 мкмоль/л 0,1 мкмоль/л 1 мкмоль/л 10 мкмоль/л 100 мкмоль/л (модель лейкемии)

2.3.5. Окрашивание МНК ПК витальным красителем CFSE

Окрашивание МНК ПК проводили для оценки пролиферативной активности клеток. Клетки захватывают флюоресцентный краситель, при делении клеток его доля в клетке, а, следовательно, и интенсивность флюоресцентного сигнала, равномерно уменьшается. Данная методика позволяет разделить делящиеся и неделящиеся клетки, оценить активность пролиферации клеток после воздействия того или иного стимула методом проточной цитофлюориметрии. Пролиферативная активность клеток оценивалась как доля пролиферирующих клеток (%). В качестве контроля использовали нестимулированные клетки (клетки, культивированные в полной среде без внесения исследуемых молекул), NTC (non-treated control).

Для проведения данного окрашивания 1×10^6 клеток отмывали PBS дважды, центрифугируя при 1500 об/мин 5 минут. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл клеточной среды RPMI-1640, не содержащей сыворотки. В клеточную суспензию вносили 5 мкл раствора CFSE в ДМСО (1,12 мкмоль/мкл), тщательно перемешивали и инкубировали в термостате в течение 5 мин ($T=37^\circ\text{C}$). Свободный краситель удаляли отмывкой 1 мл FCS с центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, повторной отмывкой 10 мл PBS, содержащего 10% FCS с

центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в необходимом объеме полной среды, использовали для дальнейшего культивирования.

2.3.6. Анализ экспрессии поверхностных клеточных маркеров методом проточной цитофлуориметрии

Фенотипирование исследуемых клеток, а также оценка экспрессии функциональных молекул проводились методом многоцветной проточной цитометрии на цитофлуориметрах FACS Canto II, BD, CyAn Daco, Beckman Coulter с последующим анализом (ПО FACS Diva, BD; Summit, Kaluza, Beckman Coulter). Для определения позитивной популяции при оценке экспрессии изучаемых молекул использовали негативный контроль, FMO-контроль (Fluorescence Minus One), а также изотипические контроли. Биологическим контролем являлись клетки без обработки (NTC, non-treated control). Образцы МНК ПК исследовались в двух технических повторах для каждого донора, образцы опухолевых клеток и iPSCs исследовались в 3 биологических повторах.

Исследуемые клетки культивировали в течение 72 часов в присутствии свободных дендримеров (1 мкмоль/л) или их комплексов (150 нмоль/л в эквиваленте РНК) в стандартных условиях ($T=37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , увлажненная атмосфера) в плоскодонных культуральных планшетах. Количество клеток составляло 500 000 в 2 мл общего объема,

Для проведения окрашивания поверхностных молекул исследуемых клеток моноклональными флуоресцентно-мечеными антителами $0,3-0,5 \times 10^6$ клеток вносили в пробирки для цитометрического анализа в объеме, не превышающем 100 мкл. В каждую пробирку вносили соответствующую смесь антител (количество индивидуальных антител определялось согласно инструкции производителя) в соответствии со схемой эксперимента и используемыми контролями. Клеточную суспензию аккуратно перемешивали на вихревом смесителе Vortex на средних оборотах, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Отмывали избыточное количество антител добавлением 2 мл буфера PBS с 0,02% EDTA и 1% FCS (центрифугирование при 1200 об/мин. в течение 5 минут), удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали в 300-350 мкл буфера, использовали для дальнейшего анализа.

2.3.7. Оценка жизнеспособности клеток

Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью колориметрических методов с использованием тетразолиевых красителей (MTT, WST). Присутствующие в клетках NADPH-зависимые оксидоредуктазы восстанавливают красители до формазана, имеющего пурпурное окрашивание.

Клетки культивировали в 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах в соотношении 10 000 клеток в 100 мкл полной среды (опухолевые клетки), 100 000 клеток в 100 мкл полной среды (МНК ПК). Клетки инкубировали в течение 72 ч в присутствии свободных дендримеров или их комплексов в стандартных условиях (Т=37°C, 5% CO₂, увлажненная атмосфера). В качестве контрольного образца использовали необработанные клетки (NTC, non-treated control). Каждая точка имела 3-5 технических повторов для опухолевых клеток и iPSCs, 2 технических повтора для каждого донора.

MTT-тест: после инкубирования в лунки вносили по 10 мкл раствора MTT в ДМСО (0,5 мг/мл), тщательно пипетировали, инкубировали 3 ч в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (Т=37°C, 5% CO₂, увлажненная атмосфера). В качестве контроля фона использовали пробу с идентичным объемом полной среды. Далее в лунки вносили 100 мкл MTT Lysis buffer, содержащего изопропанол, Triton X-100 и соляную кислоту (на 50 мл буфера: 45 мл 99% изопропанола, 5 мл Triton X-100, 330 мкл 25% соляной кислоты), тщательно пипетировали, инкубировали при комнатной температуре в темноте при постоянном перемешивании 20 мин. После этого производилась детекция показателей оптического поглощения на планшетном ридере (Paradigm plate reader, Molecular devices) при длинах волн 570 нм и 650 нм согласно рекомендациям производителя.

WST-1 тест: в каждую лунку культурального планшета вносили 10 мкл WST-1, тщательно перемешивали, инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4 ч в стандартных условиях (Т=37°C, 5% CO₂, увлажненная атмосфера). В качестве контроля фона использовали пробу с идентичным объемом полной среды. После этого производилась детекция показателей оптического поглощения на планшетном ридере (Infinite F50, Tecan, Austria, GmbH) при длинах волн 450 нм и 620 нм согласно рекомендациям производителя.

Полученные данные использовали для вычисления относительного показателя оптического поглощения $A_{\text{отн}}$, характеризующего жизнеспособность клеток:

$$A_{\text{отн}} = \frac{A_X}{A_{\text{NTC}}} \times 100\%$$

Где A_X – значение оптического поглощения для образца X, A_{NTC} – значение оптического поглощения для контрольного образца (NTC).

Полученные данные использовались для вычисления показателя IC₅₀ с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (см. Раздел 2.3.13).

2.3.8. Оценка индукции апоптоза

Оценка параметров индукции апоптоза производилась методом цитофлюориметрического анализа клеток, окрашенных PI, пропидия йодидом и моноклональными антителами к аннексину V Annexin V-FITC. Для работы с МНК ПК использовался FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI, с последующей детекцией флюоресценции на проточном цитометре FACS Canto II. Параметры апоптоза определяли в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Для работы с опухолевыми клетками и iPSCs использовался Muse® Annexin V & Dead Cell Kit с последующим анализом на Guava® Muse® Cell Analyzer. Мы анализировали параметры индукции апоптоза, как соотношение популяций живых (AnV⁻/PI⁻), раннеапоптотических (AnV⁺/PI⁻) и позднеапоптотических/некротических (AnV⁺/PI⁺) клеток.

Клетки в количестве 5×10^5 /мл инкубировали в течение 72 ч в 12-луночной планшете в присутствии свободных дендримеров (10 мкмоль/л) или дендриплексов (150 нмоль/л в эквиваленте РНК в соответствии с соотношением зарядов; или отдельные компоненты в соответствующих концентрациях) в стандартных условиях (T=37°C, 5% CO₂, увлажненная атмосфера). После культивирования клетки собирали и отмывали стандартным образом.

МНК ПК: Клетки (5×10^5) ресуспендировали в 100 мкл Annexin-V (AnV)/PI dual-stain solution (0.1 мкг Annexin-V FITC, 1 мкг PI), инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре. Затем клетки ресуспендировали в Annexin binding buffer и использовали для последующего анализа методом проточной цитофлюориметрии.

Опухолевые клетки и iPSCs: В клеточную суспензию, содержащую $1-5 \times 10^5$ в 100 мкл PBS вносили 100 мкл Muse Annexin V & Dead Cell Reagent, тщательно перемешивали, инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Анализировали образцы методом проточной цитофлюориметрии.

2.3.9. Оценка активности ЛДГ

Колориметрический анализ активности ЛДГ проводилась согласно рекомендациям производителя тестового набора LDH Assay Kit Colorimetric. Клетки (МНК ПК) культивировали в условиях, аналогичных описанным в разделе 2.3.8 «Оценка параметров индукции апоптоза» (5×10^5). Затем клетки отмывали холодным PBS, гомогенизировали в 2-4 объемах холодного Assay Buffer на льду, центрифугировали при 4°C и 10000 g в течение 15 мин для удаления нерастворимого осадка из образцов. В качестве временных точек для анализа после добавления LDH Reaction Mix были выбраны периоды в 10 и 20 мин. Оптическая плотность образцов

измерялась на планшетном ридере (Infinite F50, Tecan, Austria, GmbH) при длинах волн 450 нм и 620 нм согласно рекомендациям производителя.

2.3.10. Интернализация дендриплексов в МНК ПК

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

Клетки культивировали 4 ч в 12-луночных плоскодонных планшетах (100 000 клеток на 500 мкл среды) в присутствии свободных дендримеров, флюоресцентно-меченной микроРНК amiR-155-FAM (150 нмоль/л) и их комплексов (150 нмоль/л в эквиваленте РНК в соответствии с соотношением зарядов) в стандартных условиях ($T=37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , увлажненная атмосфера). Затем клетки собирали, отмывали дважды холодным PBS, содержащим 10%FCS и 0,02% EDTA (центрифугирование при 1200 об/мин. в течение 5 минут). Для удаления молекул, прилипших на поверхность клеток, между отмывками клетки обрабатывали кислым глициновым буфером в течение 30 сек (50 ммоль/л, pH 3.0). Клетки фиксировали 4% раствором PFA и анализировали. Цитометрический анализ проводили на проточных цитофлюориметрах FACS Canto II и CyAn Daco.

Интернализация флуоресцентно-меченых дендриплексов также исследовалась с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки инкубировали с комплексами BDEF33 или AE2G3, свободной amiR-155-FAM или свободными дендримерами как описано выше. Затем клетки дважды промывали 2 мМ раствором ЭДТА в PBS и фиксировали смесью этанол:ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1. Клетки тщательно ресуспендировали, чтобы избежать агрегирования после этапа фиксации, и помещали на предметные стекла.

Затем препараты подвергали фазово-контрастной микроскопии для визуализации цитоплазмы и ядер клеток в проходящем свете. После этого препараты были покрыты DAPI-содержащим антифейд-реагентом Pro Long Gold, содержащим DAPI (Invitrogen MP, США) для предотвращения обесцвечивания красителей и дальнейшей идентификации ядер клеток.

Фазово-контрастную, а также флуоресцентную микроскопию выполняли на флуоресцентном микроскопе «Axioscope-40» (Zeiss, Германия) с ртутной лампой высокого давления HBO 50W, комплектами интерференционных фильтров Zeiss (набор №49 для DAPI) и ПЗС-матрицей. камера «AxioCam 503 mono» (при разрешении 1936×1460 пикселей и разрядности 14 бит). Изображения ядер, окрашенных DAPI, и сигналы FAM регистрировались отдельно с

помощью программного пакета «ZEN-2012» (Zeiss, Германия) при X1000 (рис. S1). Время экспозиции настраивалось автоматически.

2.3.11. Оценка продукции перфорина и гранзима В

МНК ПК условно здоровых доноров культивировали в течение 72 ч в присутствии исследуемых молекул и комплексов. После этого клетки окрашивали флюоресцентно-меченными антителами к поверхностным маркерам CD3-APC, CD8-PE/Cy7, CD16-PerCP, CD56-APC/Cy7 для выделения субпопуляций Т-киллерных и NK-клеток. Далее клетки обрабатывали фиксирующим буфером (Cytotfix; BD Biosciences), пермеабелизировали буфером Cytoperm (BD Biosciences) согласно рекомендациям производителя и проводили окрашивание внутриклеточных мишеней флюоресцентно-меченными антителами granzyme B-PE, perforin-FITC. Нами были использованы изотипические контроли того же производителя. Клетки анализировали на проточном цитофлюориметре FACS Canto II.

2.3.12. Оценка секреции цитокинов

Для оценки секреции цитокинов мы использовали следующие тестовые наборы:

- МНК ПК: наборы для иммуноферментного определения концентрации в сыворотке крови интерлейкина-10, интерлейкина-4, TNF α , и IFN γ (Вектор-БЕСТ, Новосибирск, Россия);
- Опухолевые клетки: Human IL-10 ELISA MAX Deluxe kit (Biolegend)

После культивирования клеток с исследуемыми молекулами и их комплексами (см протокол выше) отбирали супернатанты и анализировали уровень цитокинов согласно рекомендациям производителя. Измеренные значения оптического поглощения выражали как долю (%) от значений, полученных для необработанного контроля (NTC).

2.3.13. 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 $p < 0,05$. Визуализацию данных проводили с помощью программ GraphPad Prism 7 (GraphPad Software), BioRender.com (<https://biorender.com/>), Draw.io (<https://app.diagrams.net/>).

3. Результаты собственных исследований

3.1. Иммуномодулирующие свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК (МНК ПК условно здоровых доноров)

3.1.1. Оценка собственного токсического эффекта дендримеров

Для оценки токсического эффекта дендримеров использовался метод WST, предполагающий оценку изменения показателя оптического поглощения по сравнению с необработанным контролем (NTC) как меру определения жизнеспособности исследуемых клеток.

Для обоих исследуемых дендримеров, AE2G3 и BDEF33, наблюдался дозозависимый токсический эффект (см. **Рисунок 3-1**). Отметим, что для карбосиланового дендримера BDEF33, однако, 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).

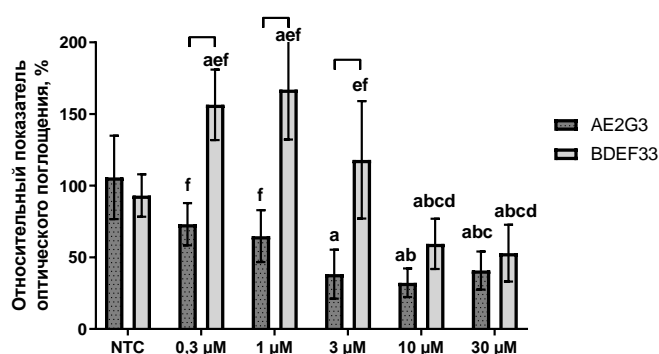


Рисунок 3-1. Оценка собственных токсических эффектов катионных фосфорных (AE2G3) и карбосилановых (BDEF33) дендримеров третьего поколения на жизнеспособность МНК ПК условно здоровых доноров после 72 ч совместного культивирования.

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (non-treated control, NTC); “b” – по сравнению с дендримером в концентрации 0,3 мкМ; “c” – по сравнению с дендримером в концентрации 1 мкМ; “d” – по сравнению с дендримером в концентрации 3 мкМ; “e” – по сравнению с дендримером в концентрации 10 мкМ; “f” – по сравнению с дендримером в концентрации 30 мкМ. Скобки обозначают достоверные различия ($p < 0,05$) между показателями для разных дендримеров.

Важно отметить, что количества дендримеров, используемые для формирования дендриплексов (0,66 мкМ для AE2G3, 1,31 мкМ для BDEF33, см Раздел 2.3.2), при этом оказываются значительно ниже токсических доз обоих дендримеров, что может свидетельствовать о безопасности применения дендриплексов для первичных клеточных культур неопухолевых клеток в условии *in vitro*.

3.1.2. Оценка параметров интернализации микроРНК в МНК ПК

Мы обнаружили, что дендримеры могут эффективно транспортировать микроРНК в МНК ПК условно здоровых доноров ($p=0,0006$ по сравнению с NTC для AE2G3/miR; $p=0,0013$ для BDEF33/miR; $p=0,0006$ 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 ($p=0,031$), что, предположительно, может быть объяснено его меньшим сродством к белкам сыворотки и большей эффективностью захвата комплексов (см Рисунок 3-2).

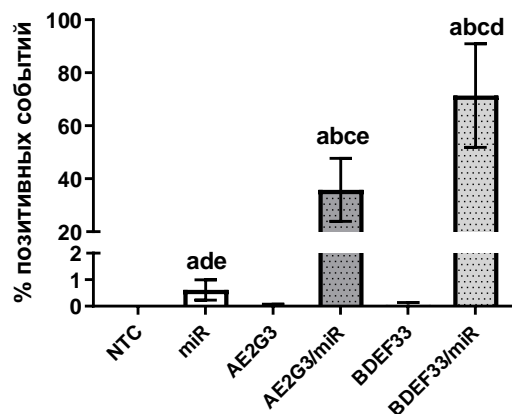


Рисунок 3-2. Оценка эффективности интернализации комплексов дендримеров с флуоресцентно меченной микроРНК (miR-155-FAM) в МНК ПК условно здоровых доноров (4 ч), определявшейся как доля FAM-позитивных клеток при проведении проточной цитофлуориметрии.

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером; “c” – по сравнению со свободной miR; “d” по сравнению с AE2G3/miR; “e” – по сравнению с BDEF33/miR

Сходные результаты были получены и при проведении флуоресцентной микроскопии (см Рисунок 3-3).

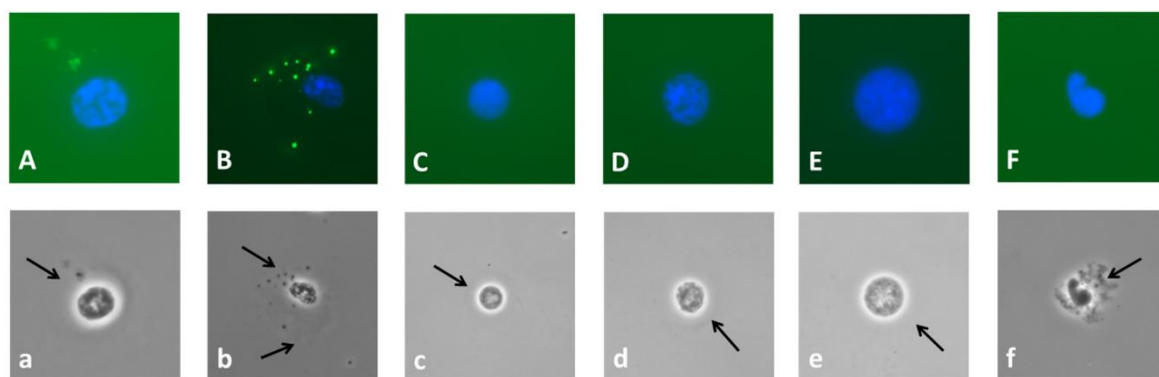


Рисунок 3-3. Флюоресцентная микроскопия образцов МНК ПК, обработанных дендриплексами или их свободными компонентами. Заглавными буквами (A-F) отмечены флуоресцентные изображения при X1000. Зеленые пятна представляют собой miR, меченные FAM, а ядро окрашено DAPI (синий). Строчные буквы (a-f) представляют соответствующие фазово-контрастные изображения при X400, где цитоплазма указана стрелками. Комплексы AE2G3/miR (A) и BDEF33/miR (B) эффективно захватываются клетками; в то время как показатели интернализации свободных дендримеров AE2G3 (C) и BDEF33 (D), а также свободной miR (E) не отличались от контроля (F).

3.1.3. Оценка цитотоксических эффектов дендриплексов

Ранее мы описали дозозависимый токсический эффект дендримеров в отношении МНК ПК условно здоровых доноров, проявляющийся уже в относительно низких концентрациях. При этом концентрации, используемые для формирования дендриплексов, оказываются ниже значений IC₅₀, рассчитанных выше для обоих дендримеров: 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33 (против 3,02±1,12 мкМ и >30 мкМ соответственно).

В то же время, 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 (см **Рисунок 3-4**). Свободные олигонуклеотиды также не снижали жизнеспособности клеток.

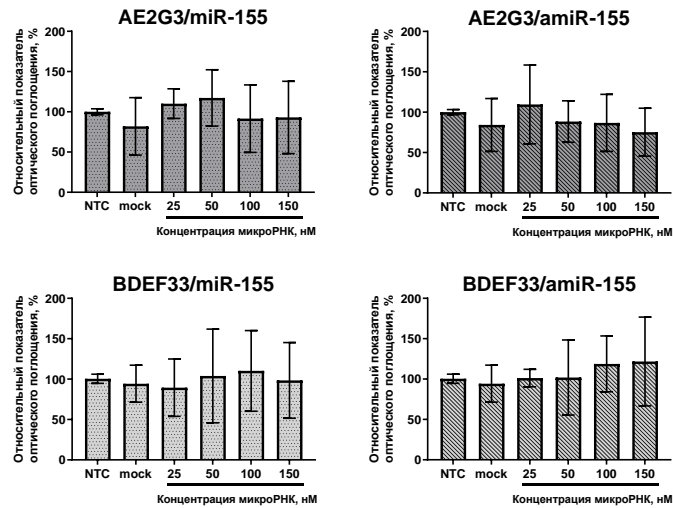


Рисунок 3-4. Оценка собственных токсических эффектов комплексов катионных фосфорных (AE2G3) и карбосилановых (BDEF33) дендримеров третьего поколения с различными типами микроРНК на жизнеспособность МНК ПК условно здоровых доноров после 72 ч совместного культивирования. Mock – свободный дендример в концентрации, соответствующей таковой в дендриплексе с максимальным содержанием микроРНК (150 нМ РНК – 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33).

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 (см **Рисунок 3-5**).

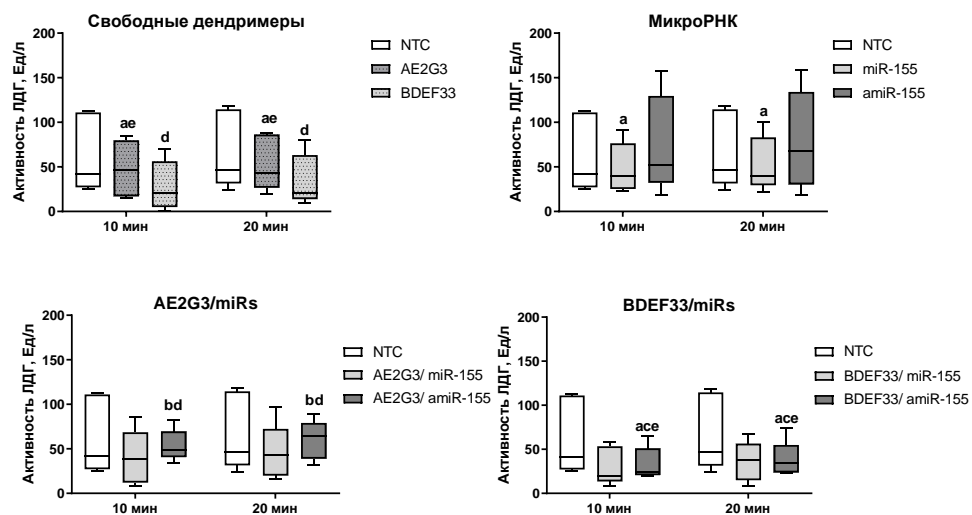


Рисунок 3-5. Оценка активности ЛДГ после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров и свободных микроРНК (10 минут, 20 минут). NTC – non-treated control, необработанные клетки.

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером (mock-контроль в концентрации

0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33); “с” – по сравнению со свободной микроРНК (150 нМ); “d” – по сравнению с AE2G3-содержащим дендриплексом (AE2G3 при сравнении свободных дендримеров); “e” – по сравнению BDEF33-содержащим дендриплексом (BDEF33 при сравнении свободных дендримеров).

Более того, нами не было обнаружено значимой индукции апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов после 72 часов культивирования (см Рисунок 3-6).

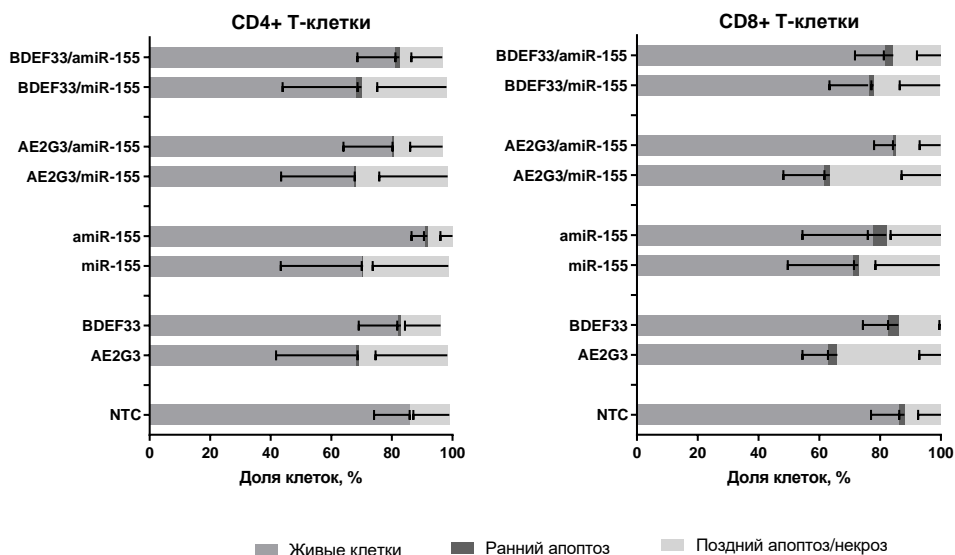


Рисунок 3-6. Оценка выраженности апоптоза в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров и свободных микроРНК (72 ч).

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером (токс-контроль в концентрации 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33); “с” – по сравнению со свободной микроРНК (150 нМ); “d” – по сравнению с AE2G3-содержащим дендриплексом; “e” – по сравнению с BDEF33-содержащим дендриплексом.

Таким образом, мы можем принять положение о том, что дендриплексы обладают достаточно высокой биосовместимостью при исследовании на данной модели.

3.1.4. Оценка влияния дендриплексов на субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток

На следующем этапе нашей работы мы оценивали то, как дендриплексы меняют соотношение различных субпопуляций лимфоцитов и их пролиферативную активность после 72 ч совместного культивирования (см Рисунок 3-7, Рисунок 3-8).

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. Мы предполагаем, что это может быть связано с относительно низкой эффективностью интернализации исследуемых комплексов в Т-клетки.

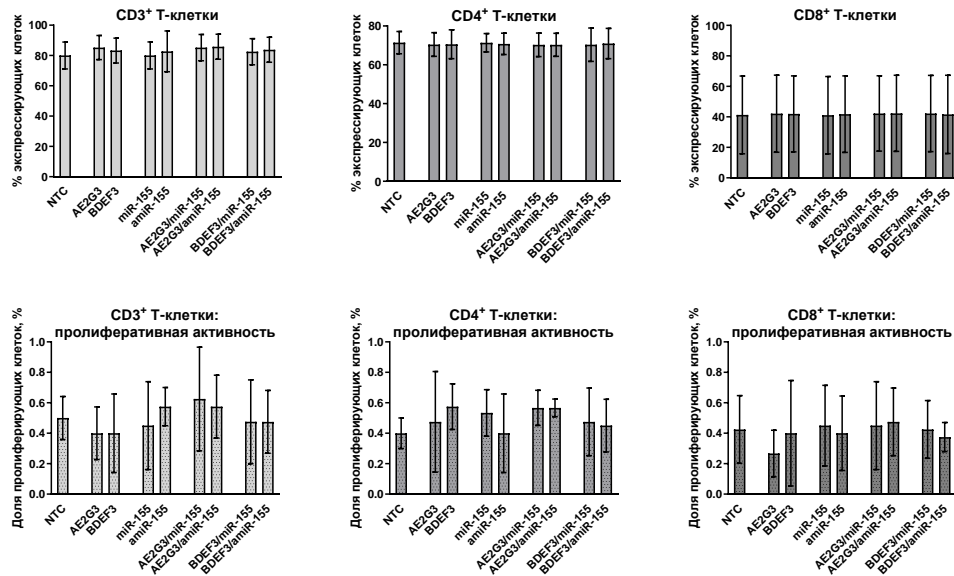


Рисунок 3-7. Оценка фенотипического состава и пролиферативной активности Т-лимфоцитов после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров и свободных микроРНК (72 ч).

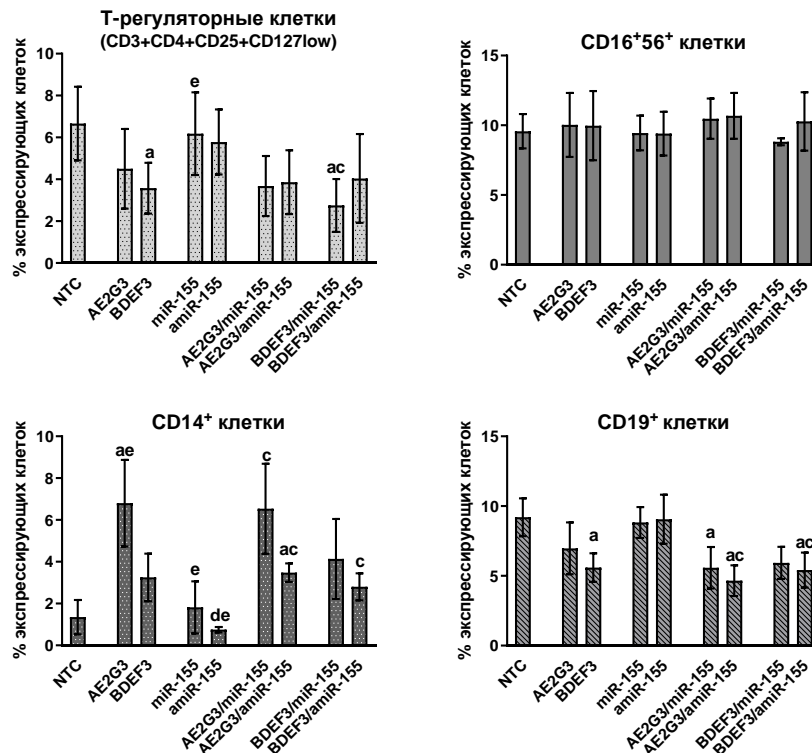


Рисунок 3-8. Оценка доли $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$, $CD16^+CD56^+$, $CD14^+$ и $CD45^+CD19^+$ клеток после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров и свободных микроРНК (72 ч).

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером (токс-контроль в концентрации 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной микроРНК (150 нМ); “d” – по сравнению с AE2G3-содержащим дендриплексом; “e” – по сравнению BDEF33-содержащим дендриплексом.

В то же время внесение дендримеров способствовало некоторому 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 ($p=0,063$).

При этом интересно, что свободная miR155 в меньшей степени способствовала снижению относительного количества Т-регуляторных клеток, чем дендриплексы на ее основе AE2G3/miR-155 (тенденция, $p=0,063$) и BDEF33/miR-155 ($p=0,016$).

Доля CD16⁺CD56⁺ NK-клеток имела тенденцию к увеличению по сравнению с контролем при использовании дендриплексов AE2G3/miR-155 ($p=0,063$) и AE2G3/amiR-155 ($p=0,063$).

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).

Такой паттерн изменения доли различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в культуре выглядит достаточно противоречиво по отношению к описанным ранее литературным данным [Dudda и др., 2013; Huffaker и др., 2012; Lu и др., 2009; Su и др., 2017a], об иммуностимулирующих эффектах miR-155, но, вероятно, его можно объяснить избирательной чувствительностью разных типов клеток к дендримерам, например, из-за разной проницаемости клеточной мембраны. Интересно, что выбор конкретного типа микроРНК (miR155 или ее ингибитора) не привел к существенному изменению направленности эффекта.

3.1.5. Оценка влияния дендриплексов на экспрессию поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток

Отдельным вопросом нашей работы была оценка экспрессии маркеров активации в ответ на воздействие дендриплексов. Для этой цели нами были выбраны такие молекулы, как CD25 и HLA-DR, поздние маркеры активации, чья экспрессия повышается через 48-72 ч после

воздействия [Reddy и др., 2004; Viallard и др., 2001]. Отметим, что в данной работе использовались неактивированные МНК ПК для оценки «нативного» эффекта исследуемых молекул.

Мы не обнаружили изменений доли CD25-позитивных клеток ни среди CD4⁺, ни среди CD8⁺ Т-лимфоцитов ни в одной из групп (см **Рисунок 3-9**).

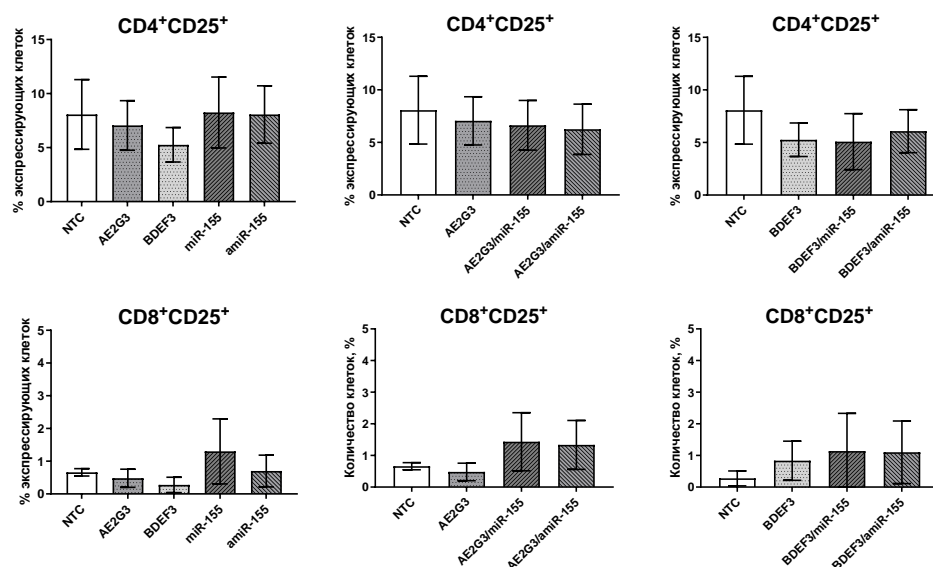


Рисунок 3-9. Оценка доли CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер активации CD25 после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров (токс-контроль – 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33) и свободных микроРНК (150 нМ) (72 ч). NTC – non-treated control, необработанные клетки.

В то же время отмечалось увеличение относительного количества CD4⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов при обработке комплексами AE2G3/miR-155 ($p=0,0313$) (см **Рисунок 3-10**).

CD8⁺ Т-лимфоциты оказались более чувствительными – 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 ($p=0,002$).

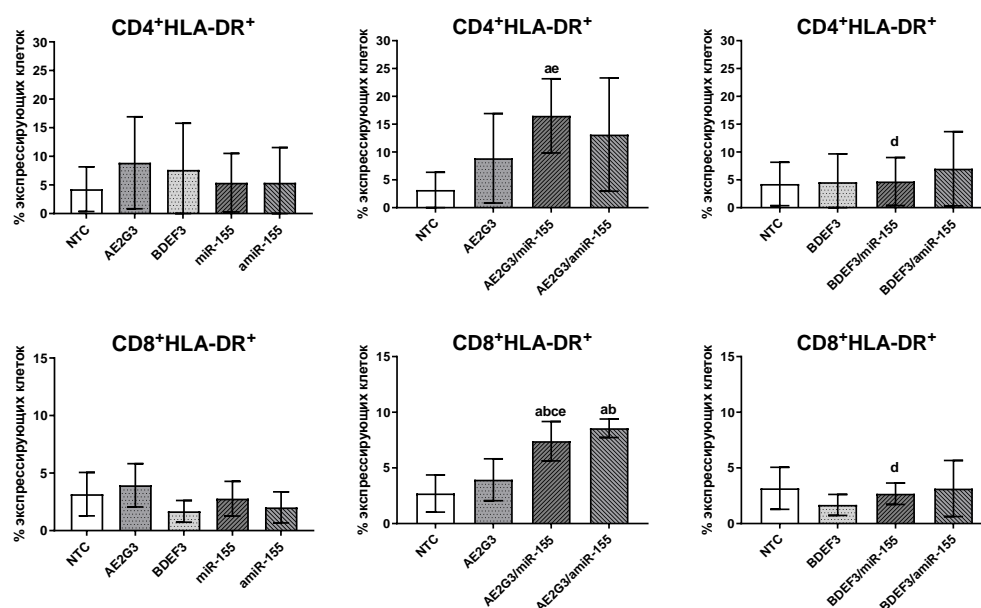


Рисунок 3-10. Оценка доли CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер активации HLA-DR после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров и свободных микроРНК (72 ч). NTC – non-treated control, необработанные клетки.

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (non-treated control, NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером (токс-контроль в концентрации 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной микроРНК (150 нМ); “d” – по сравнению с AE2G3-содержащим дендриплексом; “e” – по сравнению BDEF33-содержащим дендриплексом.

Описанные выше данные показывают, что исследуемые дендриплексы могут влиять на активационный статус иммунокомпетентных клеток. На следующем этапе мы оценивали долю клеток, экспрессирующих PD-1 – маркер, участвующий в регуляции иммунного ответа путем подавления провоспалительной активности клеток и индукции толерантности; кроме того, рассматривающийся как маркер истощения Т-клеток при патологических процессах [Fife, Pauken, 2011; Francisco, Sage, Sharpe, 2010; He, Xu, 2020; Jubel и др., 2020; Kumagai и др., 2020; Schillebeeckx и др., 2022; Thibult и др., 2013; Zinselmeyer и др., 2013].

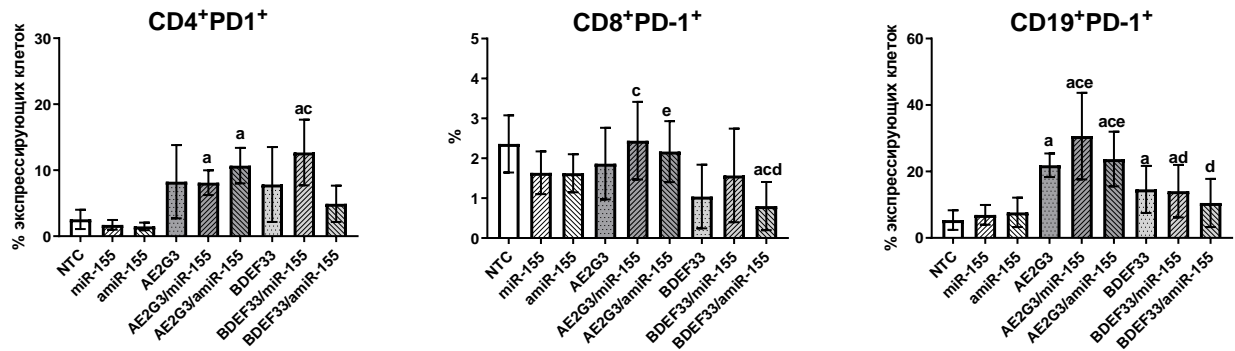


Рисунок 3-11. Оценка доли PD-1-позитивных T- и B-лимфоцитов после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров и свободных микроРНК (72 ч).

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером (токс-контроль в концентрации 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной микроРНК (150 нМ); “d” – по сравнению с AE2G3-содержащим дендриплексом; “e” – по сравнению BDEF33-содержащим дендриплексом.

Ни свободные дендримеры, ни свободные микроРНК не изменяли значимо долю PD-1-позитивных клеток среди CD4⁺ T-лимфоцитов (см **Рисунок 3-11**). 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). Дендриплексы были более эффективны в этом отношении, чем свободные микроРНК ($p=0,016$ для BDEF33/miR-155 и $p=0,06$ для обоих дендриплексов с AE2G3), в то же время эффекты дендримеров и соответствующих им комплексов значимо не различались.

Напротив, мы наблюдали снижение относительного количества CD8⁺ T-клеток, экспрессирующих PD-1, по сравнению с контролем: данный эффект наблюдался при внесении в культуру комплекса BDEF33/amiR-155 ($p=0,016$). В то же время, стоит отметить, что описываемые изменения происходили в узком диапазоне значений.

CD19⁺ B-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).

Отметим, что увеличение экспрессии PD-1 на CD19⁺ клетках вступает в некоторое противоречие с фактом снижения количества CD19⁺ субпопуляции после культивирования с дендриплексами. Вероятное объяснение может быть связано с тем, что CD19⁺ клетки могут более

активно интернализировать частицы, что обеспечивает более высокий токсический эффект на них (меньшее количество клеток); изменение экспрессии PD-1 может быть связано с вовлечением оси PD-1-PD-L1 в метаболическую регуляцию и окислительный стресс клеток [Gilad и др., 2019; Patsoukis и др., 2020].

3.1.6. Оценка влияния дендриплексов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток

На следующих этапах исследования мы могли бы ожидать изменений экспрессии перфорина и/или гранзима В, либо изменений продукции цитокинов, в соответствии с литературными данными о влиянии miR-155 на указанные параметры [Ge и др., 2017; Pashangzadeh и др., 2021]. В то же время мы не обнаружили изменений, либо они были слабо выраженными.

Мы не выявили достоверных изменений в продукции гранзима В и перфорина цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами и NK-клетками ни в одной из исследуемых групп (см Рисунок 3-12).

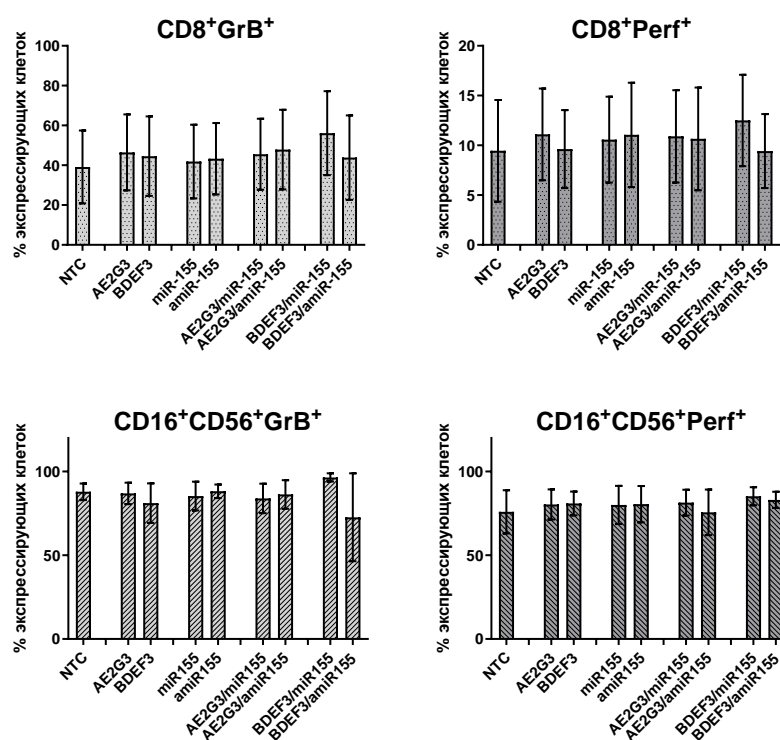


Рисунок 3-12. Оценка количества CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK-клеток (CD16⁺CD56⁺), экспрессирующих гранзим В (GrzB) и перфорин (Perf) после внесения в культуру МНК ПК дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендримеров (токс-контроль – 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33) и свободных микроРНК (150 нМ) (72 ч).

Мы также не выявили значимых изменений продукции TNF α и IFN γ в исследуемых группах, секреция IL-10 несколько 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 (см **Рисунок 3-13**).

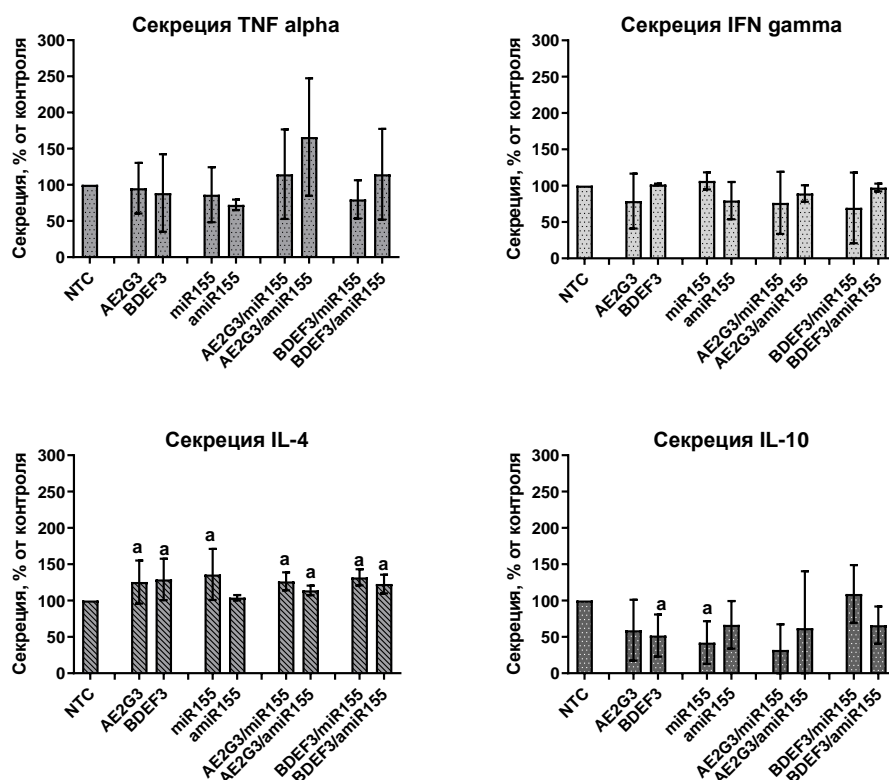


Рисунок 3-13. Оценка содержания цитокинов в супернатантах культуры МНК ПК после внесения дендриплексов (концентрация соответствует концентрации микроРНК 150 нМ), свободных дендимеров и свободных микроРНК (72 ч).

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендимером (токс-контроль в концентрации 0,66 мкМ для AE2G3 и 1,31 мкМ для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной микроРНК (150 нМ); “d” – по сравнению с AE2G3-содержащим дендриплексом; “e” – по сравнению с BDEF33-содержащим дендриплексом.

3.1.7. Краткие результаты раздела 3.1

Суммируя полученные нами данные, могут быть выделены следующие ключевые результаты, обобщенные в **Таблица 3-1**.

1. Дендримеры AE2G3 и BDEF33 имеют собственный дозозависимый токсический эффект (более выраженный для AE2G3) в средних и высоких концентрациях (более 3 мкмоль/л).

2. Комплексы дендример/miR эффективно транспортируют РНК в иммунокомпетентные клетки (BDEF33> AE2G3).
3. Дендриплексы не проявляют значимого токсического эффекта в отношении МНК ПК и отдельных субпопуляций (CD4⁺, CD8⁺).
4. Дендриплексы обладают слабовыраженными иммуномодулирующими свойствами.

Таблица 3-1. Краткое представление результатов Раздела 3.1: эффекты дендримеров и их комплексов с микроРНК на количественные и функциональные показатели иммунокомпетентных клеток.

	D	D/miR-155	D/amiR-155
AE2G3	↑CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ (p=0.06) ↓Treg (p=0.06) ↓CD19 ⁺ (p=0.06) ↑CD19 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD14 ⁺ ↑IL-4	↑CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ ↑CD4 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ ↓Treg (p=0.06) ↓CD19 ⁺ ↑CD19 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD14 ⁺ ↑IL-4	↑CD4 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ ↓Treg (p=0.06) ↓CD19 ⁺ ↑CD19 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD14 ⁺ ↑IL-4
BDEF33	↑CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ (p=0.06) ↓Treg (p=0.06) ↓CD19 ⁺ (p=0.06) ↑CD19 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD14 ⁺ ↑IL-4	↑CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ ↑CD4 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ ↓Treg (p=0.06) ↓CD19 ⁺ ↑CD19 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD14 ⁺ ↑IL-4	↑CD4 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ ↓Treg (p=0.06) ↓CD19 ⁺ ↑CD19 ⁺ PD1 ⁺ ↑CD14 ⁺ ↑IL-4
D – свободный дендример; D/miR-155 – комплекс дендримера с микроРНК-155; D/amiR-155 – комплекс дендримера с синтетическим ингибитором микроРНК-155. ↑ – увеличение относительного количества позитивных клеток или секреции цитокина; ↓ – снижение относительного количества позитивных клеток или секреции цитокина			

3.2. Противоопухолевые свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК

3.2.1. Оценка влияния дендримеров на жизнеспособность опухолевых клеток

Для оценки токсического эффекта дендримеров использовался метод WST, предполагающий оценку изменения показателя оптического поглощения по сравнению с необработанным контролем (NTC) как меру определения жизнеспособности исследуемых 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 **Рисунок 3-14**). При этом интересно, что при использовании AE2G3 в концентрации 100 мкМ отмечалось увеличение параметров жизнеспособности. Это может объясняться тем, что в высокой концентрации дендример AE2G3 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 AE2G3 наблюдалось невооруженным глазом), возможность таких эффектов ранее также описывались в литературе [Maszewska и др., 2003].

В целом, активность дендримеров в отношении Jurkat была сопоставима с таковой для доксорубина.

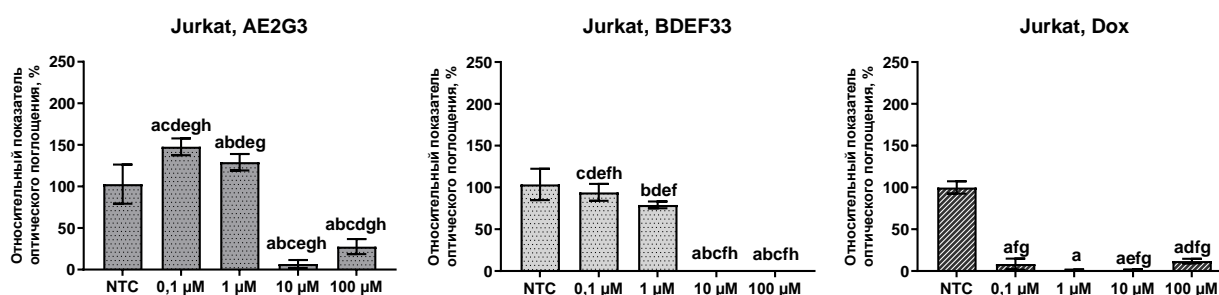


Рисунок 3-14. Оценка собственных токсических эффектов катионных фосфорных (AE2G3) и карбосилановых (BDEF33) дендримеров третьего поколения на относительную жизнеспособность опухолевых клеток линии Jurkat после 72 ч совместного культивирования по сравнению со стандартным химиопрепаратом доксорубином (Dox).

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению с дендримером в концентрации 0,1 мкМ; “c” – по сравнению с дендримером в концентрации 1 мкМ; “d” – по сравнению с дендримером в концентрации 10 мкМ; “e” – по сравнению с дендримером в концентрации 100 мкМ; “f” – по сравнению с AE2G3 в той же

концентрации; “g” – по сравнению с BDEF33 в той же концентрации; “h” – по сравнению с доксорубицином в той же концентрации.

В Таблица 3-2 приведены значения IC50 исследуемых веществ для клеток линии Jurkat (Т-клеточная лейкемия) и МНК ПК условно здоровых доноров в качестве контроля неопухолевых клеток.

Таблица 3-2. Показатели IC50 (мкМ) свободных дендримеров и доксорубицина для клеток линии Jurkat и МНК ПК условно здоровых доноров.

IC50 (мкМ)	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 (см Рисунок 3-15). 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.

Ряд культур (BTSC233, JHH520, NCH644) демонстрировали парадоксальное повышение жизнеспособности при использовании высоких концентраций AE2G3 (100 мкМ), в то же время жизнеспособность GBM1, U87 характеризовалась отсутствием такого пика. Мы предполагаем, что формирующиеся в условиях высокой концентрации супрамолекулярные ассоциаты AE2G3 по-разному интернализуются различными типами опухолевых клеток.

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

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

IC50 (мкМ)	BDEF33	AE2G3	TMZ[Vargas-Toscano и др., 2020]
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	Модель не позволяет вычислить значение IC50

iPS cells	6,08 ± 4,46	3,51 ± 1,82	Модель не позволяет вычислить значение IC50
-----------	-------------	-------------	---

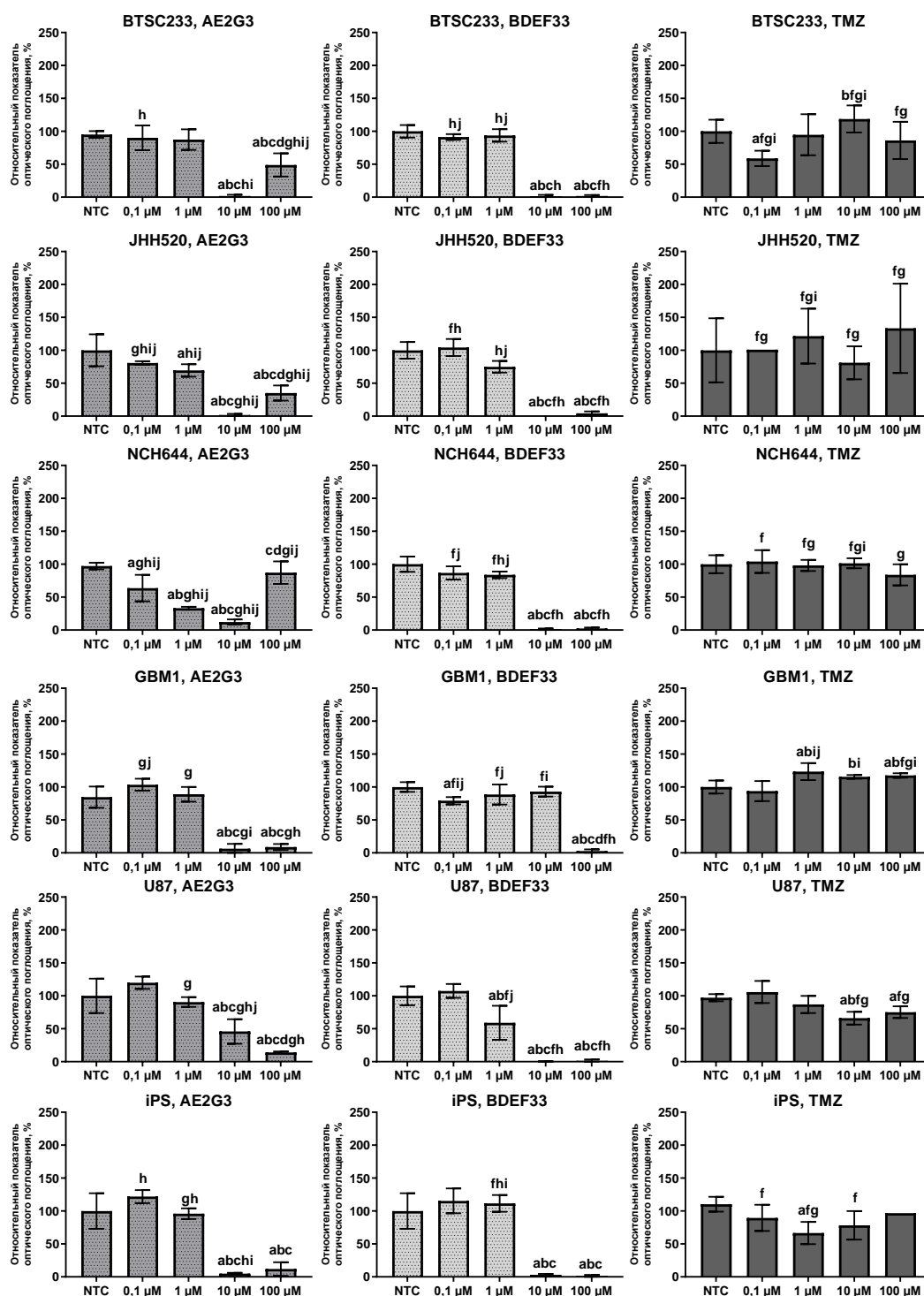


Рисунок 3-15. Оценка собственных токсических эффектов катионных фосфорных (AE2G3) и карбосилановых (BDEF33) дендримеров третьего поколения на относительную жизнеспособность опухолевых клеток линий глиобластомы и iPS клеток (iPSCs) после 72 ч совместного культивирования по сравнению со стандартным химиопрепаратом темозоломидом (TMZ).

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению с дендримером в концентрации 0,1 мкМ; “c” – по сравнению с дендримером в концентрации 1 мкМ; “d” – по сравнению с дендримером в концентрации 10 мкМ; “e” – по сравнению с дендримером в концентрации 100 мкМ; “f” – по сравнению с AE2G3 в той же

концентрации; “g” – по сравнению с BDEF33 в той же концентрации; “h” – по сравнению с темозоломидом в той же концентрации; “i” – по сравнению со U87; “j” – по сравнению с iPSCs.

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 (см **Рисунок 3-16**). 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 ($p=0,05$).

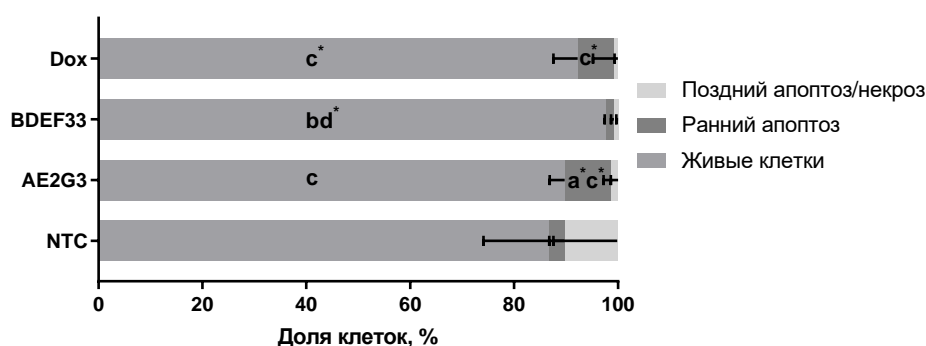


Рисунок 3-16. Оценка параметров индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat после 72 ч совместного культивирования со свободными дендримерами по сравнению со стандартным химиопрепаратом доксорубицином (Dox) (72 ч); концентрация исследуемых веществ 10 мкМ.

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначает различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (non-treated control, NTC); “b” – по сравнению с AE2G3 в той же концентрации; “c” – по сравнению по сравнению с BDEF33 в той же концентрации; “d” – по сравнению по сравнению с доксорубицином в той же концентрации.

В отношении клеточных линий глиобластомы ситуация была иной (см **Рисунок 3-17**) – 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.

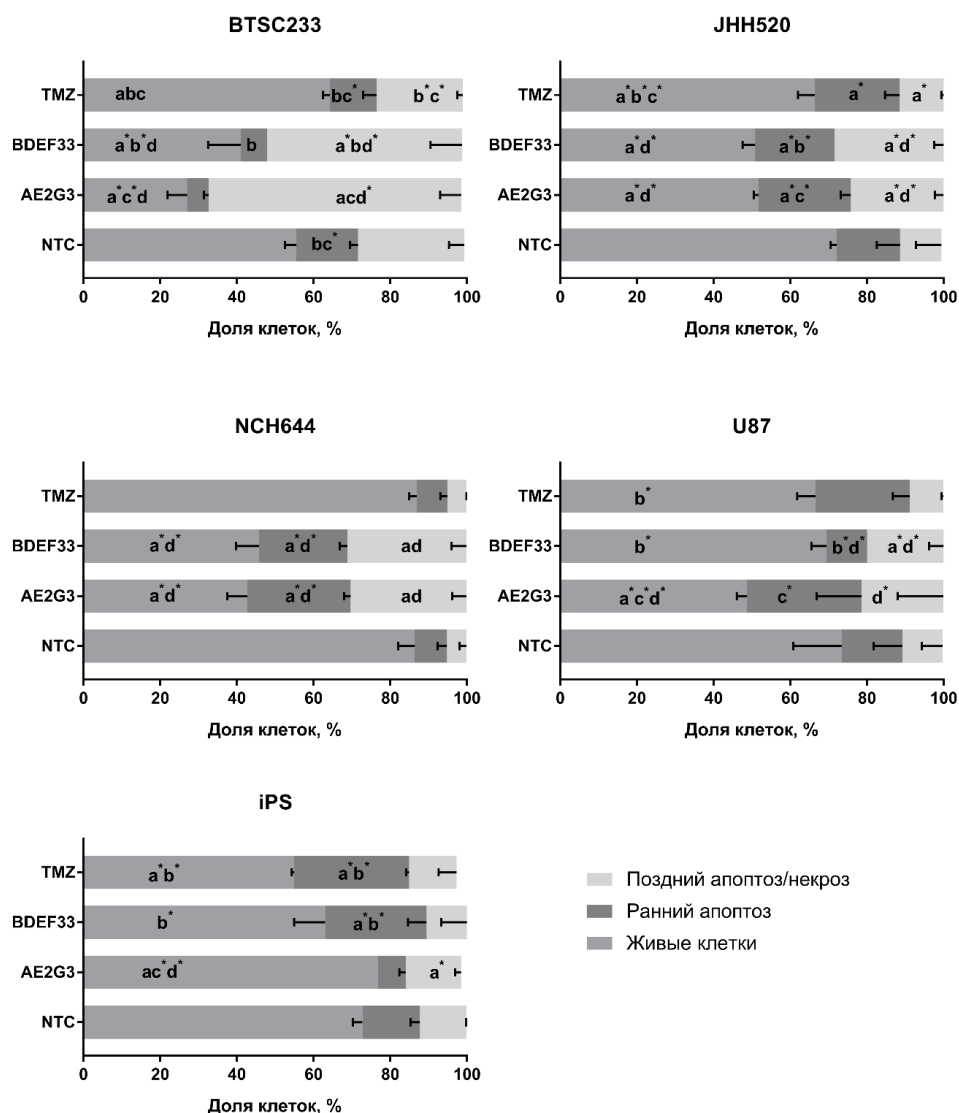


Рисунок 3-17. Оценка параметров индукции апоптоза опухолевых клеток линий глиобластомы и iPS после 72 ч совместного культивирования со свободными дендримерами по сравнению со стандартным химиопрепаратом темозоломидом (TMZ) (72 ч); концентрация исследуемых веществ 10 мкМ.

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначает различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению с AE2G3 в той же концентрации; “c” – по сравнению с BDEF33 в той же концентрации; “d” – по сравнению с темозоломидом в той же концентрации.

4.1.1. 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 3-18).

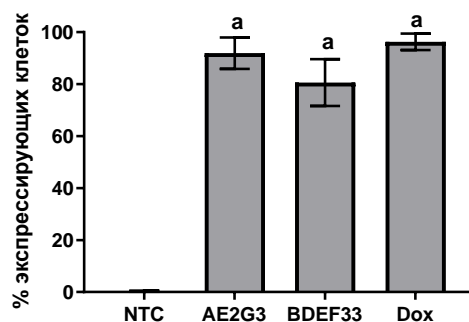


Рисунок 3-18. Оценка доли PD-L1-позитивных клеток линии Jurkat после 72 ч культивации с дендимерами; концентрация исследуемых веществ – 3 мкМ.

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначают различия при $p = 0,05$; “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC).

При исследовании того же параметра в культурах линий глиобластомы результаты различались в зависимости от клеточной линии (см **Рисунок 3-19**). Так, использование дендимеров 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.

Экспрессия PD-L1 на iPSCs возрастала при использовании AE2G3 ($p=0,00512$) и BDEF33 ($p=0,0274$).

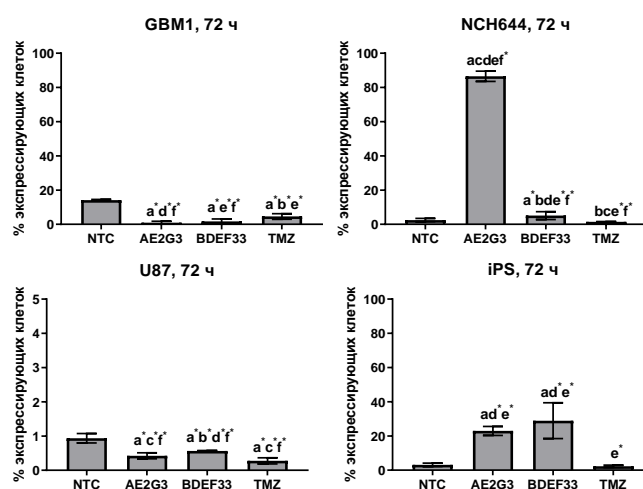


Рисунок 3-19. Оценка доли PD-L1-позитивных клеток после 72 ч совместного культивирования по сравнению со стандартным химиопрепаратом темозоломидом (TMZ) (72 ч); концентрация исследуемых веществ – 3 мкМ.

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначает различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным AE2G3; “c” – по сравнению со свободным BDEF33; “d” – по сравнению со свободным темозоломидом; “e” – по сравнению со U87; “f” – по сравнению с iPS.

Отметим, что относительное количество опухолевых клеток Jurkat и NCH644, экспрессирующих TIM3 и CD47, также возрастало после культивирования с дендримерами (см **Рисунок 3-20**): 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.

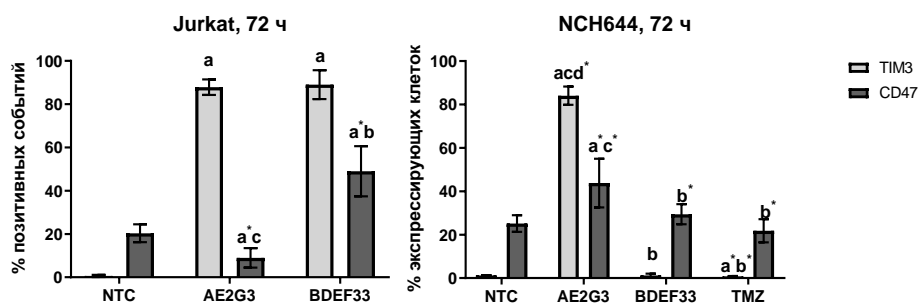


Рисунок 3-20. Оценка относительного количества опухолевых клеток линий Jurkat и NCH644, экспрессирующих TIM3, CD47, после 72 ч совместного культивирования со свободными дендримерами (72 ч); концентрация исследуемых веществ – 3 мкМ.

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначает различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению с AE2G3 в той же концентрации; “c” – по сравнению с BDEF33 в той же концентрации; “d” – по сравнению с темозоломидом в той же концентрации.

4.1.2. Эффект дендримеров на секрецию IL-10 опухолевыми клетками

Немаловажным параметром, описывающим взаимоотношения опухоли и ее микроокружения (в частности, иммунного микроокружения), является продукция IL-10, цитокина с иммуносупрессорным действием.

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 (см **Рисунок 3-21**). Клетки линии NCH644 оказались более чувствительны к дендримеру AE2G3 (тенденция, $p=0,05$).

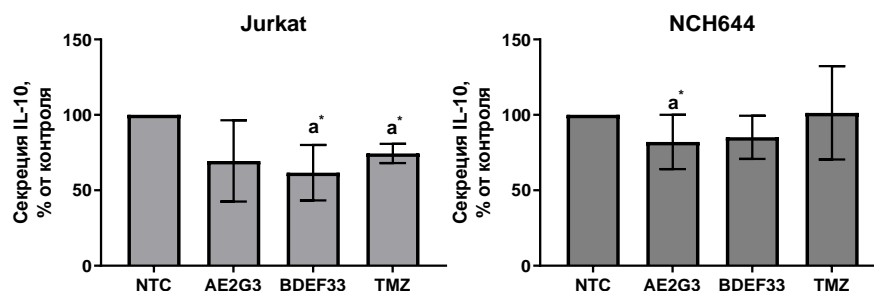


Рисунок 3-21. Оценка секреции цитокина IL-10 в культурах опухолевых клеток после 72 ч совместного культивирования со свободными дендримерами по сравнению со стандартным химиопрепаратом темозоломидом (TMZ) (72 ч).

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначат различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” по сравнению со свободным AE2G3; “c” – по сравнению со свободным BDEF33; “d” – по сравнению со свободным темозоломидом.

4.1.3. 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 3-22).

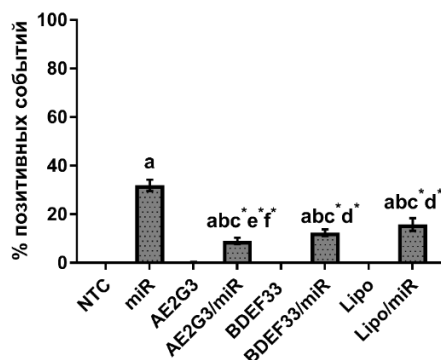


Рисунок 3-22. Оценка эффективности интернализации комплексов дендримеров с флюоресцентно меченной микроРНК в клетки линии Jurkat по сравнению с липофектамино 3000 (Lipo) (4 ч).

*Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначат различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером; “c” – по сравнению со свободной miR; “d” по сравнению с AE2G3/miR; “e” – по сравнению с BDEF33/miR; “f” – по сравнению с Lipo/miR.*

Картина меняется при переходе к модели глиобластомы (см **Рисунок 3-23**). Культуры, представляющие собой модели опухолевых стволовых клеток глиобластомы, наиболее активно интернализуют комплексы микроРНК с AE2G3, при этом эффективность интернализации превышает таковую как для свободной микроРНК, так и для комплексов с дендримером BDEF33 и стандартно используемым для трансфекции липофектаминоом 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 липофектаминоом 3000. В то же время именно BDEF33 оказался наиболее эффективным носителем микроРНК для доставки в iPSCs (это может объяснять и большую токсичность BDEF33 для данного типа клеток, показанную ранее).

Таким образом, мы продемонстрировали, что дендримеры могут работать как эффективные носители микроРНК. Подобные результаты также наблюдались ранее для доставки siРНК в стволовые клетки глиобластомы, клетки HeLa и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, причем транспортная активность дендримеров была выше, чем у липофектамина 2000 и липофектамина 3000 [Knauer и др., 2022; Lazniewska и др., 2013].

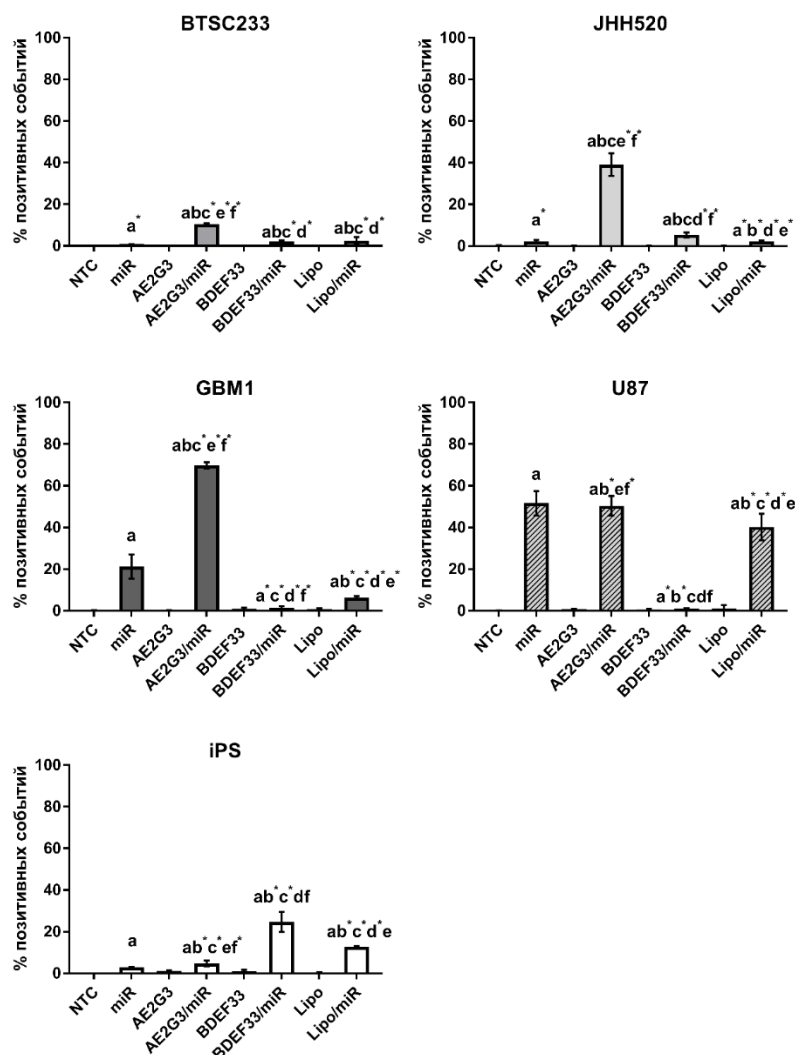


Рисунок 3-23. Оценка эффективности интернализации комплексов дендримеров с флуоресцентно меченной микроРНК в опухолевые клетки и iPS клетки по сравнению с липофектамино 3000 (Lipo) (4 ч).

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначат различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером; “c” – по сравнению со свободной miR; “d” по сравнению с AE2G3/miR; “e” – по сравнению с BDEF33/miR; “e” – по сравнению с Lipo/miR.

4.1.4. Оценка цитотоксического эффекта дендриплексов на опухолевые клетки

Учитывая противоопухолевый характер активности исследуемых олигонуклеотидов и продемонстрированную ранее дозозависимую токсическую активность дендримеров по отношению к опухолевым клеткам, наиболее ожидаемым наблюдением было бы дозозависимое снижение жизнеспособности клеток исследуемых культур и индукция апоптоза. Однако реальная картина несколько отличалась от ожидаемой.

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 3-24**). Напротив, использование BDEF33 (mock-контроль, 1,31 мкмоль /л) приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток ($p=0,0143$ по сравнению с NTC), а его комплексы снижали жизнеспособность опухолевых клеток. Отметим, что дендриплекс, содержащий максимальное количество дендримера (концентрация, соответствующая mock-контролю) имел при этом меньший цитотоксический эффект, чем свободный дендример ($p=0,0079$). Любопытно также, что и в этом случае активность дендриплексов, содержащих разные типа олигонуклеотидов, была сопоставима. На основании этих данных мы можем предположить, что в отношении клеток линии Jurkat эффект дендриплекса определяется в первую очередь характеристиками дендримера, а не РНК. При этом AE2G3, формирующий ассоциаты в присутствии белков сыворотки, ожидаемо будет менее активен в отношении клеток, требующих FCS для культивирования.

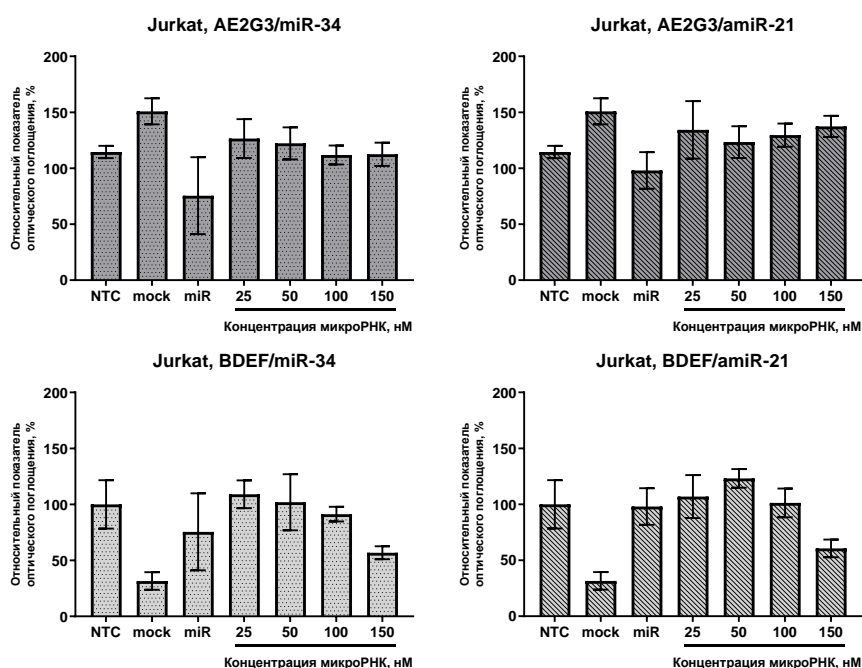


Рисунок 3-24. Оценка собственных токсических эффектов комплексов катионных дендримеров третьего поколения AE2G3 и BDEF33 на жизнеспособность опухолевых клеток линии Jurkat после 72 ч совместного культивирования с дендриплексами.

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначает различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным носителем (mock-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль /л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 25 нМ РНК; “e” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 50 нМ РНК; “f” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 100 нМ РНК; “g” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 150 нМ РНК

В то же время мы все же наблюдаем некоторое снижение количества живых клеток и увеличение числа раннеапоптотических клеток при анализе параметров индукции апоптоза при использовании AE2G3 и его комплексов (см **Рисунок 3-25**).

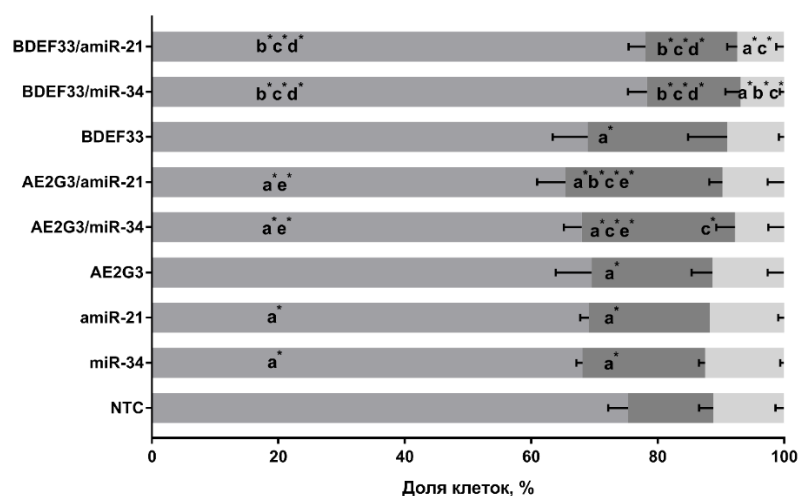


Рисунок 3-25. Оценка параметров индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat после 72 ч совместного культивирования с дендриplexами (72 ч).

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначает различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” по сравнению со свободным дендимером (токс-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль/л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с комплексом AE2G3/miR; “e” – по сравнению с комплексом BDEF33/miR.

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 (см **Рисунок 3-26**).

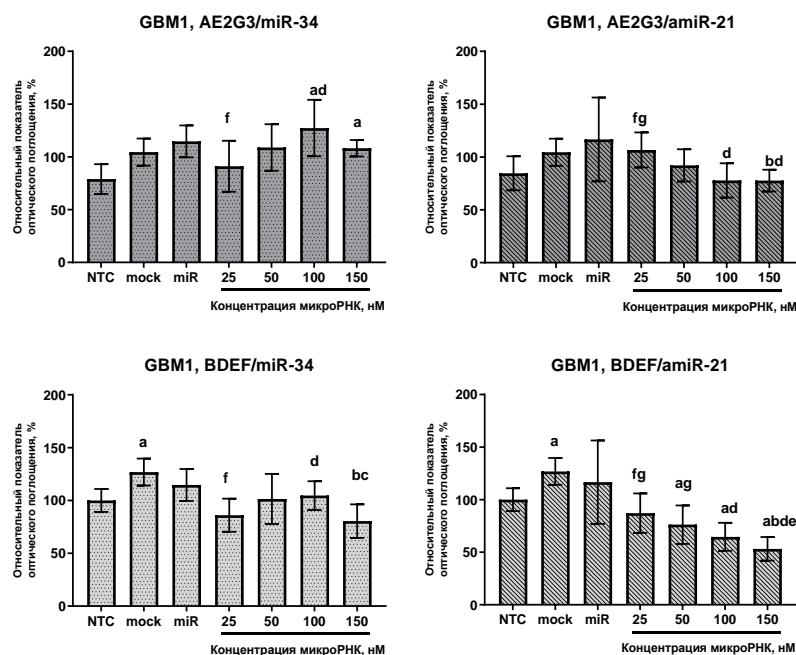


Рисунок 3-26. Оценка собственных токсических эффектов комплексов катионных дендримеров третьего поколения AE2G3 и BDEF33 на жизнеспособность опухолевых клеток линии GBM1 после 72 ч совместного культивирования с дендриplexами.

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным носителем (токс-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль/л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 25 нМ РНК; “e” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 50 нМ РНК; “f” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 100 нМ РНК; “g” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 150 нМ РНК

Это предположение подтверждается данными анализа параметров апоптоза клеток данной линии (тенденция, $p=0,05$): AE2G3 и его комплексы не демонстрировали значимого эффекта, в то время как BDEF33 и его комплексы снижали количество живых клеток и увеличивали численность раннеапоптотических (см Рисунок 3-27).

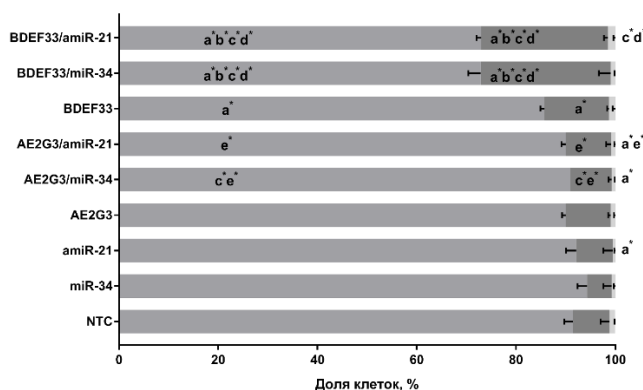


Рисунок 3-27. Оценка параметров индукции апоптоза опухолевых клеток линии GBM1 после 72 ч совместного культивирования с дендриplexами (72 ч).

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначат различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (non-treated control, NTC); “b” по сравнению со свободным дендимером (mock-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль /л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с комплексом AE2G3/miR; “e” – по сравнению с комплексом BDEF33/miR.

Другие культуры-представители категории опухолевых стволовых клеток глиобластомы JHH520, NCH644 не проявляли выраженной дозозависимой чувствительности к исследуемым комплексам, хотя и демонстрировали большую восприимчивость к BDEF33 (см **Рисунок 3-28**, **Рисунок 3-29**). Интересно, что клетки NCH644 проявляли одинаковую чувствительность к разным дозировкам дендриплексов и эффект не менялся значимо при использовании разных типов РНК, что подтверждает выдвинутое нами выше предположение: эффективность дендриплекса определяется в первую очередь свойствами дендримера.

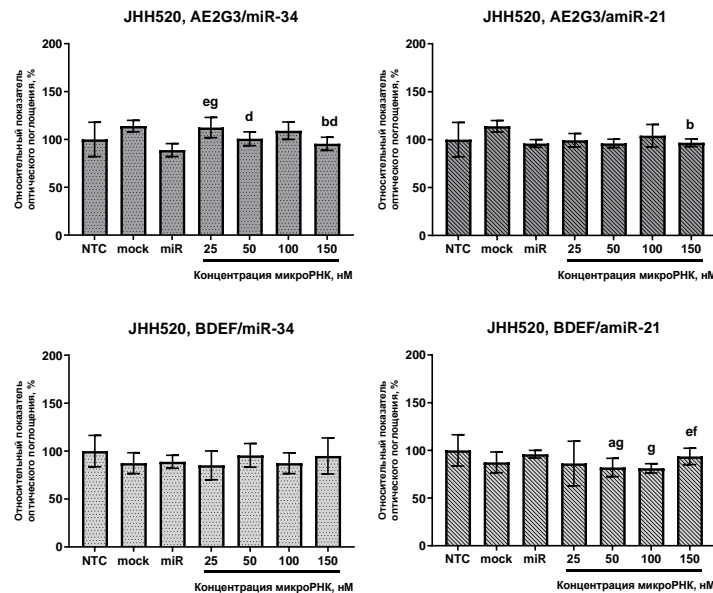


Рисунок 3-28. Оценка собственных токсических эффектов комплексов катионных дендримеров третьего поколения AE2G3 и BDEF33 на жизнеспособность опухолевых клеток линии JHH520 после 72 ч совместного культивирования с дендриплексами.

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (non-treated control, NTC); “b” – по сравнению со свободным носителем (mock-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль /л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 25 нМ РНК; “e” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 50 нМ РНК; “f” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 100 нМ РНК; “g” – по сравнению с дендриплексом, содержащим 150 нМ РНК.

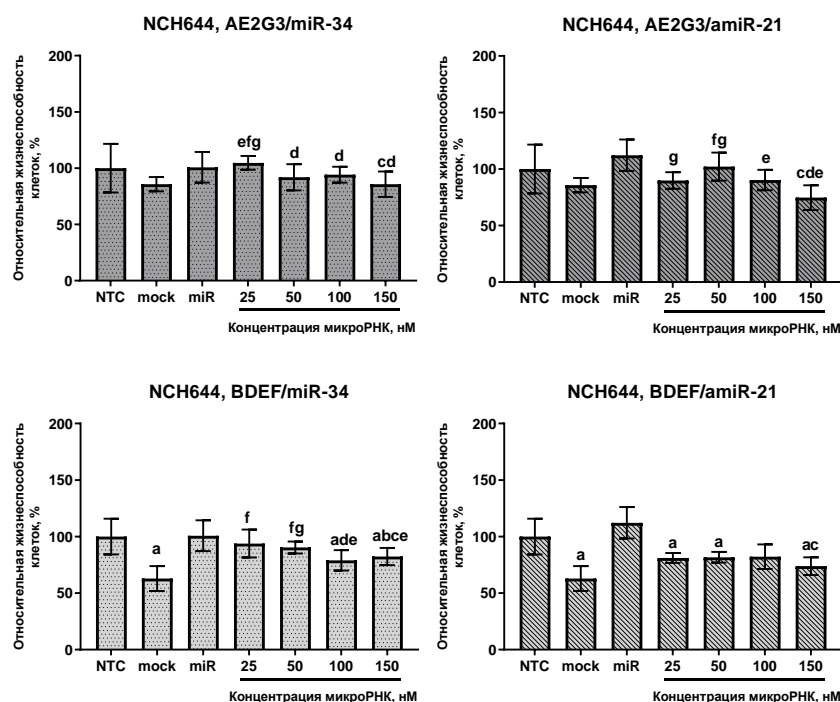


Рисунок 3-29. Оценка собственных токсических эффектов комплексов катионных дендримеров третьего поколения AE2G3 и BDEF33 на жизнеспособность опухолевых клеток линии NCH644 после 72 ч совместного культивирования с дендриplexами.

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным носителем (mock-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль/л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 25 нМ РНК; “e” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 50 нМ РНК; “f” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 100 нМ РНК; “g” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 150 нМ РНК

Иная картина наблюдалась для клеток линии U87 – здесь большей цитотоксичностью обладали комплексы AE2G3, демонстрировавшие умеренный цитотоксический эффект, при этом профили для дендриplexов, содержащих miR34 и amiR21, были сходны (см Рисунок 3-30).

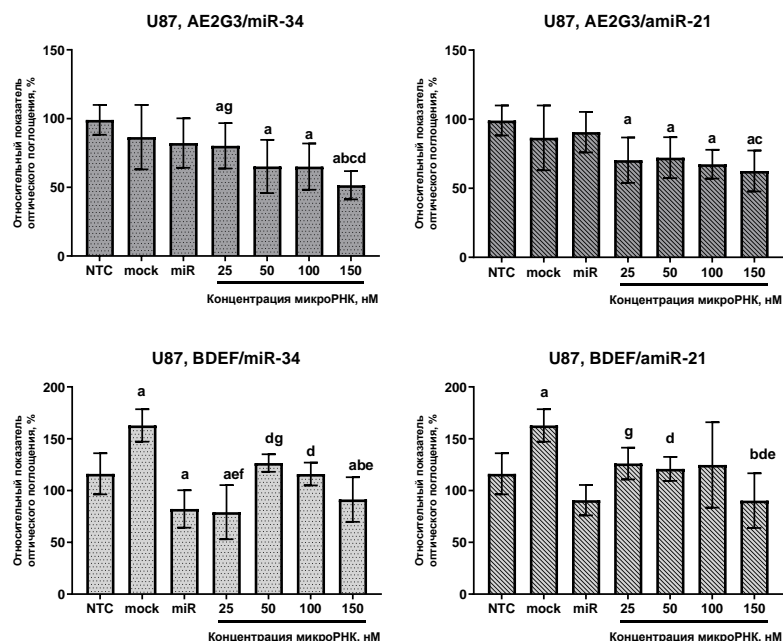


Рисунок 3-30. Оценка собственных токсических эффектов комплексов катионных дендримеров третьего поколения AE2G3 и BDEF33 на жизнеспособность опухолевых клеток линии U87 после 72 ч совместного культивирования с дендриplexами.

Буквы обозначают достоверные различия ($p < 0,05$): “a” – по сравнению с необработанным контролем (non-treated control, NTC); “b” – по сравнению со свободным носителем (токс-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль/л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR; “d” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 25 нМ РНК; “e” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 50 нМ РНК; “f” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 100 нМ РНК; “g” – по сравнению с дендриplexом, содержащим 150 нМ РНК

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, $p=0,05$) (см **Рисунок 3-31**).

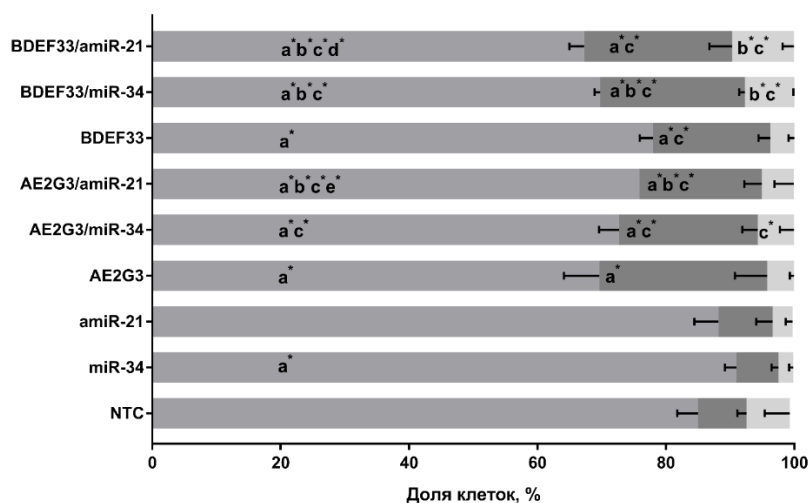


Рисунок 3-31. Оценка параметров индукции апоптоза опухолевых клеток линии U87 после 72 ч совместного культивирования с дендриplexами (72 ч).

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначат различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” по сравнению со свободным дендримером (токс-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль /л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с комплексом AE2G3/miR; “e” – по сравнению с комплексом BDEF33/miR.

4.1.5. 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 (см **Рисунок 3-32**). 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). Это коррелирует с описанными выше результатами оценки цитотоксичности дендриплексов.

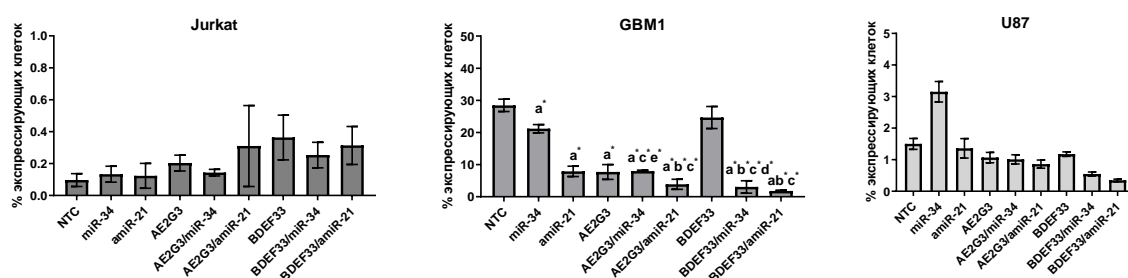


Рисунок 3-32. Оценка относительного количества опухолевых клеток линий Jurkat, GBM1, U87, экспрессирующих PD-L1, после 72 ч совместного культивирования с дендриплексами (72 ч).

Буквы обозначают различия при $p < 0,05$, отметка * обозначат различия при $p = 0,05$: “a” – по сравнению с необработанным контролем (NTC); “b” – по сравнению со свободным дендримером (токс-контроль, концентрация 0,66 мкмоль/л для AE2G3, 1,31 мкмоль /л для BDEF33); “c” – по сравнению со свободной miR (150 нМ); “d” – по сравнению с комплексом AE2G3/miR; “e” – по сравнению с комплексом BDEF33/miR.

4.1.6. Краткие результаты раздела 4.1

Суммируя полученные нами данные, могут быть выделены следующие ключевые результаты, обобщенные в **Таблица 3-4**.

1. Катионные дендримеры AE2G3 и BDEF33 обладают дозозависимым токсическим эффектом в отношении опухолевых клеток. При этом в модели глиобластомы токсичность дендримеров превышала таковую для темозоломида.

2. Комплексы дендример/miR эффективно транспортируют РНК в опухолевые клетки (транспортная активность дендримеров AE2G3 и BDEF33 в модели лейкемии была сопоставима, в модели глиобластомы AE2G3 транспортировал микроРНК более эффективно, чем BDEF33).
3. Дендримеры и их комплексы (в меньшей степени) влияют на экспрессию маркеров, характеризующих взаимодействие опухоли с иммунным микроокружением (PD-L1, TIM-3, CD47).
4. Дендримеры не меняли значимо уровень секреции IL-10 опухолевыми клетками.

Таблица 3-4. Краткое представление результатов Раздела 4.1: эффекты дендримеров и их комплексов с микроРНК на опухолевые клетки.

	Jurkat	NCH644	GBM1	U87
	Т-клеточная лейкемия	GSC, proneйральный субтип глиобластомы	GSC, классический субтип глиобластомы	"стандартная" модель глиобластомы, мехенхимальный субтип
AE2G3	↓ жизнеспособности ↑PD-L1 ↑TIM-3 ↓CD47 Интернализация miR	↓ жизнеспособности Индукция апоптоза ↑PD-L1 ↑TIM-3 ↑CD47 Интернализация miR	↓ жизнеспособности ↓PD-L1 Интернализация miR	↓ жизнеспособности Индукция апоптоза Интернализация miR
AE2G3/ miR-34			↓PD-L1	↓ жизнеспособности
AE2G3/ amiR-21			↓PD-L1	↓ жизнеспособности
BDEF33	↓ жизнеспособности ↑PD-L1, ↑TIM-3, ↑CD47 Интернализация miR	↓ жизнеспособности Индукция апоптоза Интернализация miR	↓ жизнеспособности ↓PD-L1 Интернализация miR	↓ жизнеспособности Индукция апоптоза Интернализация miR
BDEF33/ miR-34	↓ жизнеспособности	↓ жизнеспособности	↓PD-L1	↓ жизнеспособности
BDEF33/ amiR21	↓ жизнеспособности	↓ жизнеспособности	↓ жизнеспособности ↓PD-L1	

5. Обсуждение

В настоящее время микроРНК рассматриваются как один из наиболее перспективных инструментов иммуномодулирующей и противоопухолевой терапии. Их функция как регуляторов посттрансляционной регуляции генов и плеiotропная активность позволяют модулировать экспрессию генов и управлять процессами в клетках [Dasgupta, Chatterjee, 2021]. Поскольку miRs вовлечены в различные пути развития многочисленных патологических состояний, использование их аналогов или антагонистов может помочь в лечении ряда заболеваний [Jia, Wei, 2020; Labatut, Mattheolabakis, 2018]. Использование дендримеров в качестве носителей олигонуклеотидов потенциально способно снизить их деградацию в биологических средах, улучшить проникновение РНК в клетку, а также усилить действие комплекса за счет собственного эффекта дендритных молекул.

5.1. Эффекты катионных дендримеров и дендриплексов на иммунокомпетентные клетки

Для исследования возможностей воздействия на иммунокомпетентные клетки, мы выбрали микроРНК-155 (miR-155) – одну из самых известных иммуномодулирующих miR – и ее синтетический ингибитор, как агенты, доставка которых представляет большой научный интерес [Giri, Mahato, Cheng, 2019; Babar и др., 2012].

MiR-155 играет важную роль на различных этапах развития и функционирования иммунокомпетентных клеток; в настоящее время для нее описан ряд важных свойств [Su и др., 2017a], позволяющих считать ее эффективным инструментом для активации иммунного ответа, в частности, для задач иммунотерапии:

- В-клетки: продемонстрировано усиление пролиферации клеток и продукции ими IgG, в то время как в мышинной miR-155-/- модели было описано выраженное снижение числа герминативных центров и продукции антител [Su и др., 2017a].
- Т-клетки: в числе мишеней miR-155 входит супрессорный фактор SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1). Подавляя экспрессию SOCS-1 напрямую, miR-155 способствует усилению продукции IFN γ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками. В модели miR-155-knockout мышей также отмечалось снижение числа Th17-клеток. В то же время, взаимодействие с SOCS-1 связано и с поддержанием субпопуляции Т-регуляторных клеток [Dudda и др., 2013; Huffaker и др., 2012; Lu и др., 2009] – дефицит miR-155 приводит к снижению количества Т-регуляторных клеток и подавлению STAT5- и CD25-опосредованного сигналинга.

- Макрофаги: усиление экспрессии miR-155 в макрофагах способствовало M1-поляризации и подавляло M2-поляризацию [Su и др., 2017a].
- Дендритные клетки: в отсутствие miR-155 (miR-155-knockout мыши) дендритные клетки в ответ на стимуляцию липополисахаридом секретировали меньшее количество провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-12; подавление экспрессии miR-155 приводило к дефектам созревания дендритных клеток и снижению их способности активировать Т-клетки, подавляло апоптоз дендритных клеток. Однако, любопытно, что избыточная экспрессия miR-155 усиливает апоптоз дендритных клеток [Su и др., 2017a].
- NK-клетки: было показано, что высокая экспрессия miR-155 способствует увеличению численности NK-клеток и повышению их цитотоксической активности, в то время как подавление экспрессии miR-155 приводило к снижению показателя пролиферации NK-клеток в ответ на патоген [Su и др., 2017a].

Таким образом, miR-155 можно назвать агентом, связанным активацией иммунокомпетентных клеток, их выживанием и пролиферацией [Giri, Mahato, Cheng, 2019]. В связи с этим мы предполагали обнаружить ответ иммунокомпетентных клеток в виде изменения их субпопуляционного состава, изменения паттерна экспрессии ряда молекул, характеризующих функциональную активность клеток. Другим вопросом было то, какими биологическими эффектами будут обладать катионные дендримеры и их комплексы с микроРНК.

В первой части нашей работы мы исследовали биологическую активность катионных дендримеров AE2G3, BDEF33 как индивидуальных агентов, так и в качестве компонентов комплексов с miR-155 и ее синтетическим ингибитором в отношении МНК ПК условно здоровых доноров.

Полученные результаты можно обобщить следующим образом: дендримеры имеют собственный дозозависимый токсический эффект по отношению к иммунокомпетентным клеткам, более выраженный для AE2G3. В то же время использование их в качестве носителей для терапевтических олигонуклеотидов требует использования в более низких концентрациях, для снижения риска токсического воздействия. Кроме того, наличие белков в биологических средах (например, в сыворотке) способствует снижению токсичности соединений [Maszewska и др., 2003].

Дендримеры могут формировать комплексы с РНК и эффективно транспортировать их в иммунокомпетентные клетки, при этом комплексы дендример/микроРНК обладают достаточно высоким профилем биосовместимости (обладают меньшей токсичностью, нежели свободные

дендримеры), что хорошо согласуется с полученными ранее данными [Krasheninina и др., 2019; Lazniewska и др., 2013]. Отметим, что комплексы, содержащие AE2G3, интернализировались в клетки хуже, что может быть связано с более высокой способностью данного дендримера формировать крупные ассоциаты с белками сыворотки, усложняющей проникновение дендриплексов в клетки.

В то же время исследованные субпопуляции иммунокомпетентных клеток реагировали на дендриплексы, содержащие miR-155 и ее синтетический ингибитор, умеренно (и мы наблюдаем признаки, характерные, скорее, для активации), либо реакция отсутствовала, что было особенно заметно в отношении Т-клеток. Это может быть объяснено более низкой способностью к захвату наночастиц данного типа клеток. При этом CD14⁺ и CD19⁺-клетки, чья функциональная роль, вообще говоря, предполагает возможность активного захвата частиц, реагируют активнее – уменьшением числа клеток, повышением экспрессии PD-1. Вероятно, в дальнейшем может потребоваться использование специальных химических модификаций, «нацеливающих» наноконструкции на иммунные клетки различного происхождения [Sanz-Ortega, Rojas, Barber, 2020].

Другим объяснением может быть тот факт, что мы использовали неактивированные клетки, пытаясь оценить «нативный» эффект препаратов. В то же время ранее было показано, что активированные лимфоциты могут активнее инкорпорировать твердые наночастицы; интересно, что этот параметр, вероятно, зависит от фазы клеточного цикла [Boosz и др., 2021; Charpentier и др., 2020; Dodd и др., 2001].

При анализе полученных данных можно видеть, что активность дендримера и соответствующих ему дендриплексов сопоставима и, зачастую, не зависит от характеристик включенного в комплекс олигонуклеотида (направленность изменений исследуемых параметров при использовании miR-155 и amiR-155 конкордантна), что позволяет предположить, что эффект дендриплекса определяется, в первую очередь, свойствами дендримера, а также фактом формирования комплекса.

Отсутствие специфических эффектов комплексов, содержащих микроРНК-155 и ее ингибитор, требует отдельного анализа. Мы предполагаем, что причиной этому стала недостаточная активность микроРНК. При ее доставке возникает несколько критических точек: собственно, сама доставка в клетку (захват клеткой супрамолекулярного ассоциата, содержащего олигонуклеотид), высвобождение микроРНК из комплекса, включение микроРНК в RISC, – в которых потенциально могут происходить потери в эффективности. Кроме того, активность транспортируемой экзогенной микроРНК может оказаться незначимой на фоне уже имеющейся внутриклеточной базальной экспрессии (что согласуется с данными, полученными на

опухолевых моделях [Narayan, Bracken, Ekert, 2018]. Еще одно возможное объяснение связано с наличием обширной регуляторной сети микроРНК с перекрывающимися эффектами – можно предположить, что индукция или супрессия одной микроРНК «компенсируется» изменениями в экспрессии других микроРНК. Данные проблемы могут быть решены использованием «коктейля» из нескольких микроРНК или их ингибиторов для воздействия на целый участок метаболических путей; кроме того, интересной представляется возможность доставки предшественников микроРНК.

Таким образом, дендримеры продемонстрировали свою эффективность как потенциальные транспортеры терапевтических олигонуклеотидов в иммунокомпетентные клетки. Использование дендримеров и их производных может оказаться перспективным подходом для доставки лекарственных препаратов, в то же время необходимо обсуждать выбор олигонуклеотидов и необходимость химических модификаций для улучшения их транспортных свойств в каждом отдельном случае.

5.2. Противоопухолевые свойства катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК

Не менее важным, чем оценка иммуномодулирующих свойств дендримеров и их комплексов с микроРНК, нам представлялось исследование прямой противоопухолевой активности исследуемых молекул и их комплексов.

Особенно важным нам представлялся поиск релевантных моделей для данного исследования. Первым кандидатом стала линия Т-лимфобластной лейкемии человека Jurkat. Эта культура широко известна как объект для моделирования не только опухолевого процесса, но и для изучения Т-клеточного сигналинга; клетки имеют фенотип $CD4^+CD8^-$ [Moore и др., 2009].

Использование этой культуры в данной работе создает поле для сравнения эффектов дендритных молекул на опухолевые (Jurkat) и неопухолевые клетки (МНК ПК условно здоровых доноров), имеющие общую морфологию и схожие свойства, в то же время необходимость использования сыворотки в культивировании клеток создает определенные сложности в интерпретации эффектов исследуемых молекул и комплексов. Наличие сыворотки в культуральной среде потенциально может способствовать формированию относительно крупных ассоциатов за счет образования белковой короны вокруг дендриплексов, что может влиять на их интернализацию клетками и другие биологические эффекты.

Поэтому, на наш взгляд, актуальным представляется использование культур, растущих в бессывороточных средах. Культуры глиобластомы были выбраны нами по нескольким причинам. Во-первых, данные культуры растут суспензионно в среде DMEM/F12 без

использования сывороток, что минимизирует риск изменения поведения комплексов за счет формирования белковой короны. Во-вторых, в отличие от клеток линии Jurkat, культивируемых как единичные клетки в суспензии, данные клетки формируют 3D структуры, называемые нейросферами. Существование таких структур позволяет оценивать эффекты препаратов в более сложной трехмерной системе, что является несомненным преимуществом при экстраполяции данных, полученных на клеточных моделях, на реальные объекты. Интересно, что, вероятно, формирование глиобластомы и лимфом связано с привлечением общих молекулярных путей [Goethe и др., 2018; Yamanaka, Hayano, 2017].

Особый интерес вызывает возможность работы с опухолевыми стволовыми клетками, субпопуляцией опухолевых клеток, способных к самоподдержанию, и связанных с формированием, прогрессией и рецидивированием опухоли [André-Grégoire, Bidère, Gavard, 2018; Auffinger и др., 2014; Lathia и др., 2015; Orzan и др., 2017; William и др., 2018]. В настоящее время предполагается также, что опухолевые стволовые клетки могут играть ключевую роль в развитии резистентности глиобластомы к химиотерапии [André-Grégoire, Bidère, Gavard, 2018; Hotchkiss, Sampson, 2021; Melamed и др., 2018; Orzan и др., 2017; Sun, Turcan, 2021; William и др., 2018]; при этом различные модельные опухолевые линии могут иметь различную чувствительность к препаратам [Fritah и др., 2020; Lee, 2016]. Отметим, что исследуемые культуры различаются по своим молекулярно-биологическим характеристикам, относясь к разным подтипам глиобластомы.

В качестве групп сравнения мы использовали линию клеток глиобластомы человека U87 и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (iPSCs). Клетки линии U87 интересны тем, что обычно культивируются в среде, содержащей фетальную бычью сыворотку и представляют собой классическую адгезивную культуру, однако при использовании бессывороточной среды DMEM/F12 ведут себя как суспензионная культура, формирующая нейросферы [Annabi и др., 2009], что позволяет сравнивать культуры с высоким и низким содержанием клеток, имеющих плюрипотентный потенциал [Hong, Chedic, Kalkanis, 2012]. iPSCs представляют собой относительно удобный объект для сравнения плюрипотентных клеток опухолевой и неопухолевой природы; эти клетки также культивируются в бессывороточных условиях, однако они представляют собой адгерентную культуру.

В качестве терапевтических олигонуклеотидов мы выбрали miR-34, известную своими противоопухолевыми свойствами, а также синтетический ингибитор онкомиР miR-21.

MiR-34 – это одна из наиболее известных микроРНК с противоопухолевой активностью, этот эффект достигается за счет подавления экспрессии белков-ингибиторов p53, при этом

взаимодействия miR-34-p53 являются двусторонними за счет формирования петель положительной обратной связи [Navarro, Lieberman, 2015]. Известно, что экспрессия miR-34 снижена в клетках ряда опухолей – рак прямой кишки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легких, ряд гемобластозов и т.д [Zhang, Liao, Tang, 2019]. При этом предполагается, что miR-34 подавляет миграцию, инвазию и пролиферацию опухолевых клеток, индуцируя клеточный арест в G2/M-фазе клеточного цикла; также противоопухолевый эффект miR-34 связывают с подавлением химиорезистентности опухолевых клеток и супрессией стволовых клеток опухоли к используемым препаратам [Li и др., 2021; Zhang, Liao, Tang, 2019].

Противоположными эффектами обладает miR-21, относимая к onco-miRs – повышение ее экспрессии описано в патогенезе множества солидных опухолей и гемобластозов [Feng, Tsao, 2016]. Данная микроРНК подавляет активность генов-супрессоров опухолевого роста, повышение ее экспрессии связывают с устойчивостью опухолей к химиопрепаратам [Chan, Krichevsky, Kosik, 2005; Lawrie, 2013]. Кроме того, повышение экспрессии miR-21 коррелирует с распространением метастатического процесса в лимфатические узлы и ухудшением прогноза выживаемости у пациентов [Tse и др., 2022]. Подавление экспрессии miR-21 приводит к активации каспаз и индукции апоптоза опухолевых клеток [Feng, Tsao, 2016].

Оценка биологических эффектов дендримеров и их комплексов с микроРНК включала в себя ряд основных параметров, традиционно исследуемых в рамках доклинических испытаний новых терапевтических субстанций. Мы оценивали то, как дендримеры/дендриплексы влияют на жизнеспособность опухолевых клеток и на параметры индукции апоптоза по сравнению со стандартно используемыми химиопрепаратами доксорубицином (модель лейкемии) и темозоломидом (модель глиобластомы). В то же время, на наш взгляд, актуальным представляется исследование параметров, характеризующих взаимодействия между опухолью и ее микроокружением, в частности, с иммунокомпетентными клетками. Основываясь на данных литературы, мы выбрали несколько параметров: экспрессия поверхностных маркеров (PD-L1, TIM3, CD47) и секреция IL-10.

Лиганд PD-L1 взаимодействует с рецептором PD-1 иммунокомпетентных клеток, что связано с подавлением противоопухолевого иммунного ответа [Heynckes и др., 2019; Litak и др., 2019]. Более высокая экспрессия PD-L1 коррелирует со степенью тяжести заболевания и может быть использована как маркер плохого прогноза как при лейкемии [Brodská и др., 2019], так и в случае глиомы [НАО и др., 2020; Litak и др., 2019; Nduom и др., 2016; Qiu и др., 2018; Zhang и др., 2020a]. Воздействие на ось PD-1/PD-L1 и блокирование этих взаимодействий показали хорошие результаты, снижая количество истощенных Т-клеток в микроокружении (что улучшает

цитотоксический противоопухолевый эффект) и способствуя развитию иммунологической памяти [Park и др., 2019], поэтому ингибирующая терапия, направленная на PD-1 и PD-L1, играет важную роль в современных протоколах лечения глиобластомы [Delgado-Martín, Medina, 2020; Heynckes и др., 2019; Karachi и др., 2019].

Однако по мере накопления данных все чаще стал вставать вопрос о том, как экспрессия чекпойнт-молекул (таких как PD-L1) меняется на фоне проводимой химиотерапии и как это может влиять на эффективность лечения. С одной стороны, Heynckes и коллеги после лечения темозоломидом обнаружили снижение экспрессии PD-L1 в образцах глиобластомы, блокирование JAK-STAT сигналинга, потенциально связанного с ухудшением прогноза [Heynckes и др., 2019]. С другой стороны, Wang и соавторы наблюдали более активный уход клеток глиобластомы от иммунного надзора после терапии темозоломидом за счет повышения экспрессии PD-L1 [Wang и др., 2019]. Более того, эксперименты группы Karachi продемонстрировали, что использование темозоломида в стандартных терапевтических дозах в модели глиобластомы мышей приводило к повышению экспрессии PD-L1 на CD4⁺, CD8⁺ Т-клетках и Т-регуляторных клетках, также как и к возрастанию экспрессии других маркеров клеточного истощения LAG-3 и TIM-3 [Karachi и др., 2019]. Возможное объяснение этого противоречия может быть связано с тем, что потенциально PD-L1 может оказаться маркером клеточного стресса, следующего за использованием химиопрепаратов [Gilad и др., 2019]. Предполагается, что комбинация темозоломида и ингибиторов чекпойнт-молекул может помочь улучшить исходы у пациентов [Wang и др., 2019].

Другой маркер, выбранный нами, – TIM-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3), еще один негативный чекпойнт-регулятор с функциями, схожими с молекулой PD-L1; его экспрессия была выявлена на CD4⁺ Т-хелперах 1 типа и цитотоксических CD8⁺ Т-клетках, позже экспрессия TIM3 был описана на опухолевых клетках (лейкемия, глиобластома), как маркер ухудшения прогноза заболевания и резистентности к химиотерапии [Hung, Garzon-Muvdi, Lim, 2017; Li и др., 2017a; Zhang и др., 2019]. Предполагается, что TIM3 может рассматриваться как один из маркеров опухолевых стволовых клеток лейкемии [Kikushige и др., 2010] и глиобластомы [Li и др., 2017a]. При этом TIM3-сигналинг связан с дифференциацией миелоидных супрессорных клеток в опухоль-ассоциированные макрофаги и формированием «опухолевой ниши» [Lei, Lee, 2021]. Экспрессия TIM3 связана с резистентностью клеток глиобластомы к терапии темозоломидом, более того, его использование приводит к возрастанию экспрессии TIM3; в то же время, подавление экспрессии TIM3 связано к повышению уровня апоптоза [Zhang и др., 2019].

Еще один маркер, представляющий интерес – CD47, относящийся к Ig-подобным белкам; молекула CD47 связывается с SIRP α на макрофагах, нейтрофилах и дендритных клетках, приводя к подавлению их фагоцитарной и антиген-презентирующей активностей, выступая таким образом как “do not eat me”-сигнал [Hu и др., 2020]. Описана высокая экспрессия CD47 на опухолевых стволовых клетках лейкемии и глиобластомы [Li и др., 2018; Liu и др., 2019]. В целом повышение экспрессии CD47 на опухолевых клетках связывается с ухудшением прогноза как при гемобластозах [Eladl и др., 2020], так и при глиобластоме [Li и др., 2018]. В настоящее время механизмы, вовлекающие CD47 в регуляцию жизненного цикла опухолевых клеток не вполне ясны: с одной стороны, есть данные о подавлении опухолевого роста при ингибировании CD47 в ряде моделей [Li и др., 2018], с другой стороны, в клетках линии Jurkat снижение экспрессии CD47 приводит к развитию относительной резистентности к Fas-индуцированному апоптозу [Manna и др., 2005]. Неопубликованные данные группы Nguyen говорят о том, что в модели ХЛЛ терапия дазатинибом приводила к повышению экспрессии CD47, что, вероятно, тоже можно рассматривать как признак клеточного стресса.

Немаловажный аспект, связанный с уходом опухоли из-под надзора иммунной системы, – это секреция факторов с иммуносупрессивной активностью: IL-10, TGF beta, IDO и т.д. [Hotchkiss, Sampson, 2021; Hung, Garzon-Muvdi, Lim, 2017]. Известно о повышении уровня IL-10 у пациентов с глиобластомой [Albulescu и др., 2013], различными формами лейкемии [Jimbi и др., 2021; Zhang и др., 2021], что делает данный показатель важным для оценки в данной работе.

Резюмируя полученные данные, мы можем охарактеризовать результаты для каждой из моделей следующим образом:

Клетки линии Jurkat (модель лейкемии) оказались чувствительными к обоим исследуемым дендримерам (AE2G3, BDEF33), однако активность дендримеров уступала доксорубину или была сопоставима с ней. В то же время, вероятно, клеточная гибель происходила путем, отличным от апоптоза, так как при оценке его параметров в дозе, соответствующей минимальной клеточной жизнеспособности по данным МТТ, изменений выявить не удалось. Клетки реагировали на внесение дендримеров повышением экспрессии PD-L1, TIM3, в меньшей степени – CD47 (эффект более выражен для BDEF33), что может свидетельствовать о клеточном стрессе, вызванном сокультивированием с токсичными для опухолевых клеток субстанциями. Мы наблюдали некоторое снижение секреции IL-10 клетками в ответ на воздействие BDEF33 и доксорубином.

Эффективность интернализации дендриплексов была относительно невысока и уступала таковой для свободной микроРНК. По данным МТТ, использование дендриплексов на основе

AE2G3 не приводило к выраженным изменениям жизнеспособности, в то время как комплексы BDEF33 и свободный дендример стимулировали гибель клеток. Отметим, что при этом эффект дендриплекса не менялся значимо при использовании различных видов олигонуклеотидов, а свободный дендример имел наибольшую токсичность. Ни дендримеры, ни дендриплексы не влияли достоверно на экспрессию PD-L1 опухолевыми клетками.

Таким образом, дендример BDEF33, для которого формирование ассоциатов при повышении концентрации в белковосодержащей среде характерно в меньшей степени, чем для AE2G3, оказывается более активен в отношении клеток Jurkat, имеющих Т-клеточное происхождение. Этот же эффект воспроизводится при переходе к дендриплексам, при этом комплексы BDEF33 имеют сопоставимую активность, что позволяет предположить, что именно дендример оказывает ключевой вклад в эффект комплекса. В то же время клетки не остаются интактными – использование дендримеров приводит к повышению экспрессии поверхностных маркеров, потенциально свидетельствующих о клеточном стрессе.

Клетки линий глиобластомы также демонстрировали дозозависимую чувствительность к дендримерам, при этом цитотоксическая активность AE2G3 несколько превышала таковую для BDEF33. Обращают на себя внимание то, что темозоломид при этом имеет более низкую активность, чем дендримеры, а культуры опухолевых стволовых клеток более чувствительны, чем «стандартная» линия U87, что в перспективе может быть интересным для задач противоопухолевой терапии. Эти данные согласуются с результатами, полученными при исследовании апоптоза.

Отметим также, что, по-видимому, даже в таком тесте как МТТ мы наблюдаем различия в способностях разных типов опухолевых клеток к захвату исследуемых молекул. Судя по всему, в условиях использования бессывороточной культуральной среды, AE2G3 в высоких концентрациях по-прежнему формирует супрамолекулярные ассоциаты, однако, они предположительно имеют меньший размер, по сравнению с ассоциатами, формируемыми в присутствии сывороточных белков. Клетки линий U87 и GBM1 отвечают снижением жизнеспособности на использование дендримера AE2G3 в концентрации 100 мкМ, что позволяет предположить, что формирующиеся частицы эффективно интернализуются клетками и осуществляют цитотоксическое воздействие. В то же время клетки линий BTSC233, JHN520, NCH644, предположительно, хуже захватывают эти ассоциаты – поэтому мы наблюдаем повышение жизнеспособности клеток.

Выявленные различия наблюдаются и при дальнейшем исследовании. При оценке эффекта дендримеров на экспрессию PD-L1 клетки линии U87 не реагировали значимо, в то же

время клетки GBM1 характеризовались значимым снижением этого показателя. Клетки линии NCH644 реагировали лишь на дендример AE2G3 – повышением экспрессии PD-L1, TIM3, CD47. Вероятным объяснением этого феномена может стать тот факт, что клетки претерпевают изменения, связанные с окислительным стрессом, индуцированным воздействием токсических молекул.

При оценке эффективности дендримеров как транспортеров мы показали, что AE2G3 проявляет гораздо большую активность, чем BDEF33 в отношении опухолевых клеток. В то же время оба дендримера способствовали интернализации меченой РНК в диапазоне, сопоставимом или превышающем таковой для стандартного агента липофектамина 3000.

Несмотря на эффективную интернализацию, по-видимому, дендриплексы имеют относительно невысокую цитотоксическую активность, при этом показатель разнится для разных клеточных линий. Клетки JHH520 оказались наиболее устойчивыми к данному воздействию, их жизнеспособность не менялась значимо. Клетки линии NCH644 реагировали некоторым снижением жизнеспособности лишь на комплексы BDEF33, причем тип олигонуклеотида не имел значения. Линия GBM1 также оказалась более чувствительной к BDEF33-содержащим комплексам, особенно к комплексу BDEF33/amiR-21. U87-клетки, напротив, были более чувствительны к комплексам AE2G3 (AE2G3/amiR-21), хотя при анализе параметров апоптоза и комплексы BDEF33 стимулировали клеточную гибель.

Экспрессия PD-L1 на клетках линии U87 не менялась значимо под действием дендриплексов. Напротив, для клеток линии GBM1 этот показатель несколько снижался, при этом более эффективными оказывались комплексы, содержащие amiR-21.

Таким образом, дендримеры показали свою эффективность как в качестве самостоятельных противоопухолевых агентов, так и в качестве носителей терапевтических микроРНК. При этом использование указанных конструкций может приводить к изменениям в экспрессии поверхностных маркеров, характеризующих взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением.

Заключение

В рамках данного исследования была проведена комплексная оценка биологических свойств двух разновидностей катионных дендримеров 3 поколения – фосфорного (AE2G3) и карбосиланового (BDEF33) – а также их комплексов с микроРНК с иммуномодулирующими свойствами (miR-155, amiR-155) в отношении иммунокомпетентных клеток условно здоровых доноров. Было изучено влияние указанных дендримеров и их комплексов с микроРНК, обладающих противоопухолевой активностью, на жизнеспособность опухолевых клеток и экспрессию поверхностных маркеров, характеризующих их взаимодействие с иммунным микроокружением, в моделях лейкемии и глиобластомы.

Было обнаружено, что дендримеры имеют собственный дозозависимый токсический эффект как в отношении иммунокомпетентных клеток, так и в отношении опухолевых клеток. В отношении опухолевых клеток дендримеры в сравнении со стандартными химиопрепаратами могут обладать токсичностью более выраженной (темозоломид в модели глиобластомы) или же сопоставимой (доксорубин в модели лейкемии). Более того, культуры опухолевых стволовых клеток глиобластомы оказывались высоко чувствительны к воздействию дендримеров. Отметим при этом, что использование AE2G3 в высоких концентрациях или в условиях высокого содержания белка в среде значимо снижает его активность.

Было показано, что дендриплексы (комплексы катионных дендримеров и микроРНК) позволяют эффективно транспортировать олигонуклеотиды внутрь клеток, имеющих разное происхождение, дендриплексы при этом имеют высокий профиль биосовместимости для неопухолевых клеток.

Обнаруженные нами изменения субпопуляционного состава, показателей пролиферации и функциональной активности иммунокомпетентных клеток, подвергавшихся воздействию дендриплексов были слабовыраженными и большей частью были связаны с субпопуляциями клеток, способных к активному захвату частиц (CD14⁺ и CD19⁺-клетки). Важно отметить, что в работе использовались клетки без предварительной стимуляции, что также может влиять на способность клеток к захвату.

В то же время дендриплексы, содержащие микроРНК с противоопухолевым эффектом, демонстрировали цитотоксический эффект: более выраженный для BDEF33-, чем для AE2G3-содержащих комплексов; более выраженный для комплексов, содержащих amiR21, чем для комплексов с miR34. При этом чувствительность опухолевых клеток к дендримерам и

дендриплексам определяется их происхождением и индивидуальными характеристиками клеточной линии.

Мы показали, что использование дендримеров и их комплексов изменяет экспрессию поверхностных маркеров опухолевых клеток, характеризующих их взаимодействие с микроокружением. Так, внесение свободных дендримеров повышало экспрессию PD-L1, TIM3, CD47 на клетках линий Jurkat (оба дендримера), NCH644 (AE2G3), что может свидетельствовать о наступлении энергетического стресса опухолевых клеток. Данный эффект воспроизводился и при использовании дендриплексов. В то же время внесение свободных дендримеров снижало экспрессию PD-L1 на клетках линии GBM1, подобный эффект воспроизводился и при использовании дендриплексов (более выражено для комплексов, содержащих amiR-21).

Данное исследование представляет собой первую доклиническую характеристику биологических свойств катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими и противоопухолевыми микроРНК. Полученные результаты могут использоваться в дальнейшем для создания 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 свидетельствует 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 стимуляции иммунного ответа исследуемыми комплексами.
5. Внесение катионных дендримеров AE2G3 и BDEF33 в культуры опухолевых клеток линий лейкемии (Jurkat) и глиобластомы (BTSC233, JHH520, 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 литературы

1. Keshavan S. и др. Nano-bio interactions: a neutrophil-centric view // *Cell Death Dis.* 2019. Т. 10. № 8. С. 569.
2. Xu C. и др. Favorable biodistribution, specific targeting and conditional endosomal escape of RNA nanoparticles in cancer therapy // *Cancer Lett.* 2018. Т. 414. С. 57–70.
3. Giri B. R., Mahato R. I., Cheng G. Roles of microRNAs in T cell immunity: Implications for strategy development against infectious diseases // *Med. Res. Rev.* 2019. Т. 39. № 2. С. 706–732.
4. Abbott M., Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy // *Semin. Oncol. Nurs.* 2019. Т. 35. № 5.
5. Acharya N. и др. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape // *J. Immunother. Cancer.* 2020. Т. 8. № 1. С. 1–11.
6. Albulescu R. и др. Cytokine patterns in brain tumour progression // *Mediators Inflamm.* 2013. Т. 2013.
7. Andaloussi S. EL и др. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. Т. 12. № 5. С. 347–357.
8. Anderson A. C. Tim-3: An Emerging Target in the Cancer Immunotherapy Landscape // *Cancer Immunol. Res.* 2014. Т. 2. № 5. С. 393–398.
9. André-Grégoire G., Bidère N., Gavard J. Temozolomide affects Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells // *Biochimie.* 2018. Т. 155. С. 11–15.
10. Annabi B. и др. A MT1-MMP/NF- κ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells // *J. Neuroinflammation.* 2009. Т. 6. № 1. С. 8.
11. Anselmo A. C., Mitragotri S. Impact of particle elasticity on particle-based drug delivery systems // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. Т. 108. С. 51–67.
12. Aucher A., Rudnicka D., Davis D. M. MicroRNAs Transfer from Human Macrophages to Hepato-Carcinoma Cells and Inhibit Proliferation // *J. Immunol.* 2013. Т. 191. № 12. С. 6250–6260.
13. Auffinger B. и др. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy // *Cell Death Differ.* 2014. Т. 21. № 7. С. 1119–1131.
14. Babar I. A. и др. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Т. 109. № 26.

15. Ban E., Kwon T. H., Kim A. Delivery of therapeutic miRNA using polymer-based formulation // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2019. T. 9. № 6. С. 1043–1056.
16. Barenholz Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned // *J. Control. Release.* 2012. T. 160. № 2. С. 117–134.
17. Bartel D. P. MicroRNAs // *Cell.* 2004. T. 116. № 2. С. 281–297.
18. Baum C. и др. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells // *Blood.* 2003. T. 101. № 6. С. 2099–2113.
19. Bentley E. R., Little S. R. Local delivery strategies to restore immune homeostasis in the context of inflammation // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. T. 178. С. 113971.
20. Berkowitz R. и др. Construction and Molecular Analysis of Gene Transfer Systems Derived from Bovine Immunodeficiency Virus // *J. Virol.* 2001. T. 75. № 7. С. 3371–3382.
21. Bermejo J. F. и др. Water-Soluble Carbosilane Dendrimers: Synthesis Biocompatibility and Complexation with Oligonucleotides; Evaluation for Medical Applications // *Chem. - A Eur. J.* 2007. T. 13. № 2. С. 483–495.
22. Bi J. и др. miR-181a Induces Macrophage Polarized to M2 Phenotype and Promotes M2 Macrophage-mediated Tumor Cell Metastasis by Targeting KLF6 and C/EBP α // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* 2016. T. 5. С. e368.
23. Białkowska K. и др. Interaction of Cationic Carbosilane Dendrimers and Their siRNA Complexes with MCF-7 Cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. T. 22. № 13. С. 7097.
24. Biray Avcı Ç. и др. Design of polyethylene glycol-polyethylenimine nanocomplexes as non-viral carriers: mir-150 delivery to chronic myeloid leukemia cells // *Cell Biol. Int.* 2013. С. n/a-n/a.
25. Bitar A. и др. Silica-based nanoparticles for biomedical applications // *Drug Discov. Today.* 2012. T. 17. № 19–20. С. 1147–1154.
26. Bohr A. и др. Anti-Inflammatory Effect of Anti-TNF- α SiRNA Cationic Phosphorus Dendrimer Nanocomplexes Administered Intranasally in a Murine Acute Lung Injury Model // *Biomacromolecules.* 2017. T. 18. № 8. С. 2379–2388.
27. Boldin M. P. и др. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice // *J. Exp. Med.* 2011. T. 208. № 6. С. 1189–1201.
28. Boosz P. и др. Citrate-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Enable a Stable Non-

- Spilling Loading of T Cells and Their Magnetic Accumulation // *Cancers (Basel)*. 2021. T. 13. № 16. C. 4143.
29. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968. T. 97. C. 7.
30. Brodská B. и др. High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. T. 20. № 11. C. 2823.
31. Caminade A. M. Phosphorus dendrimers for nanomedicine // *Chem. Commun.* 2017. T. 53. № 71. C. 9830–9838.
32. Caminade A. M. Phosphorus dendrimers as nanotools against cancers // *Molecules*. 2020. T. 25. № 15.
33. Casadei L. и др. Exosome-Derived miR-25-3p and miR-92a-3p Stimulate Liposarcoma Progression // *Cancer Res.* 2017. T. 77. № 14. C. 3846–3856.
34. Cavazzana-Calvo M. и др. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease // *Science (80-.)*. 2000. T. 288. № 5466. C. 669–672.
35. Ceppi M. и др. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. T. 106. № 8. C. 2735–2740.
36. Chan J. A., Krichevsky A. M., Kosik K. S. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells // *Cancer Res.* 2005. T. 65. № 14. C. 6029–6033.
37. Chandran P. A. и др. The TGF- β -inducible miR-23a cluster attenuates IFN- γ levels and antigen-specific cytotoxicity in human CD8 + T cells // *J. Leukoc. Biol.* 2014. T. 96. № 4. C. 633–645.
38. Charpentier J. C. и др. Macropinocytosis drives T cell growth by sustaining the activation of mTORC1 // *Nat. Commun.* 2020. T. 11. № 1. C. 180.
39. Chen C.-Z. и др. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation // *Science (80-.)*. 2004. T. 303. № 5654. C. 83–86.
40. Chen X. и др. Exosomes derived from hypoxic epithelial ovarian cancer deliver microRNA-940 to induce macrophage M2 polarization // *Oncol. Rep.* 2017. T. 38. № 1. C. 522–528.
41. Chen Y., Xianyu Y., Jiang X. Surface Modification of Gold Nanoparticles with Small Molecules for Biochemical Analysis // *Acc. Chem. Res.* 2017. T. 50. № 2. C. 310–319.
42. Cheng C. J., Saltzman W. M. Polymer Nanoparticle-Mediated Delivery of MicroRNA Inhibition

- and Alternative Splicing // *Mol. Pharm.* 2012. T. 9. № 5. C. 1481–1488.
43. Chis A. A. и др. Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine // *Molecules*. 2020. T. 25. № 17. C. 3982.
44. Cho S. и др. miR-23~27~24 clusters control effector T cell differentiation and function // *J. Exp. Med.* 2016. T. 213. № 2. C. 235–249.
45. Cho S. и др. A Novel miR-24–TCF1 Axis in Modulating Effector T Cell Responses // *J. Immunol.* 2017. T. 198. № 10. C. 3919–3926.
46. Cooray S., Howe S. J., Thrasher A. J. Retrovirus and Lentivirus Vector Design and Methods of Cell Conditioning. , 2012. C. 29–57.
47. Cramer S. A., Adjei I. M., Labhasetwar V. Advancements in the delivery of epigenetic drugs // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015. T. 12. № 9. C. 1501–1512.
48. Cruz L. O. и др. Excessive expression of miR-27 impairs Treg-mediated immunological tolerance // *J. Clin. Invest.* 2017. T. 127. № 2. C. 530–542.
49. Curtale G. и др. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes // *Blood*. 2010. T. 115. № 2. C. 265–273.
50. Daige C. L. и др. Systemic Delivery of a miR34a Mimic as a Potential Therapeutic for Liver Cancer // *Mol. Cancer Ther.* 2014. T. 13. № 10. C. 2352–2360.
51. Dasgupta I., Chatterjee A. Recent Advances in miRNA Delivery Systems // *Methods Protoc.* 2021. T. 4. № 1. C. 10.
52. Daya S., Berns K. I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors // *Clin. Microbiol. Rev.* 2008. T. 21. № 4. C. 583–593.
53. Degboé Y. и др. Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent // *Arthritis Res. Ther.* 2014. T. 16. № 2. C. R98.
54. Delgado-Martín B., Medina M. Á. Advances in the Knowledge of the Molecular Biology of Glioblastoma and Its Impact in Patient Diagnosis, Stratification, and Treatment // *Adv. Sci.* 2020. T. 7. № 9.
55. Ding G. и др. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit

RFXAP expression via miR-212-3p // *Oncotarget*. 2015. Т. 6. № 30. С. 29877–29888.

56. Dodd C. H. и др. Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles // *J. Immunol. Methods*. 2001. Т. 256. № 1–2. С. 89–105.

57. Donatelli S. S. и др. TGF- β -inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Т. 111. № 11. С. 4203–4208.

58. Dudda J. C. и др. MicroRNA-155 Is Required for Effector CD8⁺ T Cell Responses to Virus Infection and Cancer // *Immunity*. 2013. Т. 38. № 4. С. 742–753.

59. Dzmitruk V. и др. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action // *Int. J. Pharm.* 2015. Т. 485. № 1–2. С. 288–294.

60. Ebert P. J. R. и др. An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a // *Nat. Immunol.* 2009. Т. 10. № 11. С. 1162–1169.

61. Eichmüller S. B. и др. Immune Modulatory microRNAs Involved in Tumor Attack and Tumor Immune Escape // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2017. Т. 109. № 10.

62. Eladl E. и др. Role of CD47 in Hematological Malignancies // *J. Hematol. Oncol.* 2020. Т. 13. № 1. С. 96.

63. Endo-Takahashi Y. и др. Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for the treatment of hindlimb ischemia // *Sci. Rep.* 2015. Т. 4. № 1. С. 3883.

64. Escobar T. M. и др. miR-155 Activates Cytokine Gene Expression in Th17 Cells by Regulating the DNA-Binding Protein Jarid2 to Relieve Polycomb-Mediated Repression // *Immunity*. 2014. Т. 40. № 6. С. 865–879.

65. Esposito C. L., Catuogno S., Franciscis V. de. Aptamer-MiRNA Conjugates for Cancer Cell-Targeted Delivery. , 2016. С. 197–208.

66. Esquela-Kerscher A., Slack F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. Т. 6. № 4. С. 259–269.

67. Feng Y.-H. H., Tsao C.-J. J. Emerging role of microRNA-21 in cancer // *Biomed. Reports*. 2016. Т. 5. № 4. С. 395–402.

68. Fife B. T., Pauken K. E. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance //

Ann. N. Y. Acad. Sci. 2011. T. 1217. № 1. C. 45–59.

69. Fornaguera C. и др. Novel non-viral gene delivery systems composed of carbosilane dendron functionalized nanoparticles prepared from nano-emulsions as non-viral carriers for antisense oligonucleotides // *Int. J. Pharm.* 2015. T. 478. № 1. C. 113–123.

70. Francisco L. M., Sage P. T., Sharpe A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity // *Immunol. Rev.* 2010. T. 236. № 1. C. 219–242.

71. Fritah S. и др. Temozolomide-induced rna interactome uncovers novel lncrna regulatory loops in glioblastoma // *Cancers (Basel)*. 2020. T. 12. № 9. C. 1–18.

72. Fruchon S. и др. Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer // *J. Leukoc. Biol.* 2009. T. 85. № 3. C. 553–562.

73. Fu Y., Chen J., Huang Z. Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease // *ExRNA*. 2019. T. 1. № 1. C. 24.

74. Fukao T. и др. An Evolutionarily Conserved Mechanism for MicroRNA-223 Expression Revealed by MicroRNA Gene Profiling // *Cell*. 2007. T. 129. № 3. C. 617–631.

75. Gantier M. P. и др. A miR-19 regulon that controls NF- κ B signaling // *Nucleic Acids Res.* 2012. T. 40. № 16. C. 8048–8058.

76. Gao S. и др. Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting // *Int. J. Pharm.* 2003. T. 255. № 1–2. C. 57–68.

77. Gao S. и др. Targeting delivery of oligonucleotide and plasmid DNA to hepatocyte via galactosylated chitosan vector // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005. T. 60. № 3. C. 327–334.

78. Garzon R., Marcucci G., Croce C. M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. T. 9. № 10. C. 775–789.

79. Ge J. и др. Lower expression of microRNA-155 contributes to dysfunction of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B // *Front. Immunol.* 2017. T. 8. № SEP. C. 1–12.

80. Ghorbani S. и др. MicroRNA-181 Variants Regulate T Cell Phenotype in the Context of Autoimmune Neuroinflammation // *Front. Immunol.* 2017. T. 8.

81. Ghosh R. и др. A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells // *Biomaterials*. 2013. T. 34. № 3. C. 807–816.

82. Gilad Y. и др. Drug-induced PD-L1 expression and cell stress response in breast cancer cells can

be balanced by drug combination // *Sci. Rep.* 2019. T. 9. № 1. C. 15099.

83. Goethe E. и др. Glioblastoma and acute myeloid leukemia: malignancies with striking similarities // *J. Neurooncol.* 2018. T. 136. № 2. C. 223–231.

84. Gras R. и др. Changes in Gene Expression Pattern of Human Primary Macrophages Induced by Carbosilane Dendrimer 2G-NN16 // *Pharm. Res.* 2009. T. 26. № 3. C. 577–586.

85. Gras R. и др. Carbosilane Dendrimer 2G-NN16 Represses Tc17 Differentiation in Primary T CD8+ Lymphocytes // *Mol. Pharm.* 2012a. T. 9. № 1. C. 102–110.

86. Gras R. и др. The inhibition of Th17 immune response in vitro and in vivo by the carbosilane dendrimer 2G-NN16 // *Biomaterials.* 2012b. T. 33. № 15. C. 4002–4009.

87. Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer // *Cell.* 2010. T. 140. № 6. C. 883–899.

88. Guerau-de-Arellano M. и др. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity // *Brain.* 2011. T. 134. № 12. C. 3578–3589.

89. Gulyaeva L. F., Kushlinskiy N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression // *J. Transl. Med.* 2016. T. 14. № 1. C. 143.

90. Hacein-Bey-Abina S. и др. LMO2 -Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1 // *Science* (80-.). 2003. T. 302. № 5644. C. 415–419.

91. Hao C. и др. PD-L1 expression in glioblastoma, the clinical and prognostic significance: A systematic literature review and meta-analysis // *Front. Oncol.* 2020. T. 10. № June. C. 1–10.

92. Hayder M. и др. Anti-inflammatory properties of dendrimers per se // *ScientificWorldJournal.* 2011a. T. 11. C. 1367–1382.

93. Hayder M. и др. A Phosphorus-Based Dendrimer Targets Inflammation and Osteoclastogenesis in Experimental Arthritis // *Sci. Transl. Med.* 2011b. T. 3. № 81. C. 81ra35-81ra35.

94. He X., Xu C. PD-1: A Driver or Passenger of T Cell Exhaustion? // *Mol. Cell.* 2020. T. 77. № 5. C. 930–931.

95. He Y. и др. MiR-146a Regulates IL-6 Production in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Macrophage Cells by Inhibiting Notch1 // *Inflammation.* 2014. T. 37. № 1. C. 71–82.

96. He Y. и др. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy // *Onco. Targets. Ther.* 2018. T. Volume 11. C. 7005–7009.

97. Heredero-Bermejo I. и др. Evaluation of the activity of new cationic carbosilane dendrimers on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba polyphaga* // *Parasitol. Res.* 2015. T. 114. № 2. С. 473–486.
98. Heredero-Bermejo I. и др. In vitro anti- *Acanthamoeba* synergistic effect of chlorhexidine and cationic carbosilane dendrimers against both trophozoite and cyst forms // *Int. J. Pharm.* 2016. T. 509. № 1–2. С. 1–7.
99. Heredero-Bermejo I. и др. Ultrastructural Study of *Acanthamoeba polyphaga* Trophozoites and Cysts Treated In Vitro with Cationic Carbosilane Dendrimers // *Pharmaceutics*. 2020. T. 12. № 6. С. 565.
100. Heynckes S. и др. Crosslink between Temozolomide and PD-L1 immune-checkpoint inhibition in glioblastoma multiforme // *BMC Cancer*. 2019. T. 19. № 1. С. 1–7.
101. Hirschberger S., Hinske L. C., Kreth S. MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer // *Cancer Lett.* 2018. T. 431. С. 11–21.
102. Höbel S., Aigner A. Polyethylenimines for <scp>siRNA</scp> and <scp>miRNA</scp> delivery *in vivo* // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2013. T. 5. № 5. С. 484–501.
103. Hoefig K. P., Heissmeyer V. MicroRNAs grow up in the immune system // *Curr. Opin. Immunol.* 2008. T. 20. № 3. С. 281–287.
104. Hong D. S. и др. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours // *Br. J. Cancer*. 2020. T. 122. № 11. С. 1630–1637.
105. Hong X., Chedic K., Kalkanis S. N. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: A comparison of cancer stem cell properties // *Int. J. Oncol.* 2012. T. 41. № 5. С. 1693–1700.
106. Hotchkiss K. M., Sampson J. H. Temozolomide treatment outcomes and immunotherapy efficacy in brain tumor // *J. Neurooncol.* 2021. T. 151. № 1. С. 55–62.
107. Hou J. и др. MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2 // *J. Immunol.* 2009. T. 183. № 3. С. 2150–2158.
108. Hsu S. и др. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2013. T. 9. № 8. С. 1169–1180.
109. Hu J. и др. Glioblastoma Immunotherapy Targeting the Innate Immune Checkpoint CD47-SIRPα Axis // *Front. Immunol.* 2020. T. 11. № November. С. 1–7.

110. Huang C.-Y. и др. Regulation of CD47 expression in cancer cells // *Transl. Oncol.* 2020. Т. 13. № 12. С. 100862.
111. Huang J. и др. Role of CD47 in tumor immunity: a potential target for combination therapy // *Sci. Rep.* 2022. Т. 12. № 1. С. 9803.
112. Huffaker T. B. и др. Epistasis between MicroRNAs 155 and 146a during T Cell-Mediated Antitumor Immunity // *Cell Rep.* 2012. Т. 2. № 6. С. 1697–1709.
113. Hung A. L., Garzon-Muvdi T., Lim M. Biomarkers and Immunotherapeutic Targets in Glioblastoma // *World Neurosurg.* 2017. Т. 102. С. 494–506.
114. Ibrahim A. F. и др. MicroRNA Replacement Therapy for miR-145 and miR-33a Is Efficacious in a Model of Colon Carcinoma // *Cancer Res.* 2011. Т. 71. № 15. С. 5214–5224.
115. Ihnatsyeu-Kachan A. и др. Multi-Target Inhibition of Cancer Cell Growth by SiRNA Cocktails and 5-Fluorouracil Using Effective Piperidine-Terminated Phosphorus Dendrimers // *Colloids and Interfaces.* 2017. Т. 1. № 1. С. 6.
116. Ionov M. и др. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction // *Int. J. Pharm.* 2015. Т. 485. № 1–2. С. 261–269.
117. Jäger M. и др. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Т. 41. № 13. С. 4755.
118. Ji W., Sun B., Su C. Targeting microRNAs in cancer gene therapy // *Genes (Basel).* 2017. Т. 8. № 1.
119. Jia H. и др. Gold nanoparticle-based miR155 antagonist macrophage delivery restores the cardiac function in ovariectomized diabetic mouse model // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. Т. Volume 12. С. 4963–4979.
120. Jia Y., Wei Y. Modulators of microrna function in the immune system // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Т. 21. № 7.
121. Jiang M. и др. Exosomes from MiR-30d-5p-ADSCs Reverse Acute Ischemic Stroke-Induced, Autophagy-Mediated Brain Injury by Promoting M2 Microglial/Macrophage Polarization // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. Т. 47. № 2. С. 864–878.
122. Jiang S. и др. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation // *Blood.* 2011. Т. 118. № 20. С. 5487–5497.

123. Jiang Y. и др. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019. Т. 15. № 5. С. 1111–1122.
124. Jiang Z. и др. Targeting CD47 for cancer immunotherapy // *J. Hematol. Oncol.* 2021. Т. 14. № 1. С. 180.
125. Jimbu L. и др. The Potential Advantage of Targeting Both PD-L1/PD-L2/PD-1 and IL-10–IL-10R Pathways in Acute Myeloid Leukemia // *Pharmaceuticals.* 2021. Т. 14. № 11. С. 1105.
126. Jiménez J. L. и др. Carbosilane Dendrimers to Transfect Human Astrocytes with Small Interfering RNA Targeting Human Immunodeficiency Virus // *BioDrugs.* 2010. Т. 24. № 5. С. 331–343.
127. Johnnidis J. B. и др. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223 // *Nature.* 2008. Т. 451. № 7182. С. 1125–1129.
128. Jong O. G. de и др. Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation // *Acc. Chem. Res.* 2019. Т. 52. № 7. С. 1761–1770.
129. Jubel J. M. и др. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection // *Front. Immunol.* 2020. Т. 11.
130. Kalle C. von и др. Stem cell clonality and genotoxicity in hematopoietic cells: Gene activation side effects should be avoidable // *Semin. Hematol.* 2004. Т. 41. № 4. С. 303–318.
131. Karachi A. и др. Modulation of temozolomide dose differentially affects T-cell response to immune checkpoint inhibition // *Neuro. Oncol.* 2019. Т. 21. № 6. С. 730–741.
132. Kasar S. и др. Systemic in vivo lentiviral delivery of miR-15a/16 reduces malignancy in the NZB de novo mouse model of chronic lymphocytic leukemia // *Genes Immun.* 2012. Т. 13. № 2. С. 109–119.
133. Kheirloomoom A. и др. Multifunctional Nanoparticles Facilitate Molecular Targeting and miRNA Delivery to Inhibit Atherosclerosis in ApoE –/– Mice // *ACS Nano.* 2015. Т. 9. № 9. С. 8885–8897.
134. Khong H. T., Restifo N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes // *Nat. Immunol.* 2002. Т. 3. № 11. С. 999–1005.
135. Kikushige Y. и др. TIM-3 Is a Promising Target to Selectively Kill Acute Myeloid Leukemia Stem Cells // *Cell Stem Cell.* 2010. Т. 7. № 6. С. 708–717.

136. Kikushige Y. TIM-3 in normal and malignant hematopoiesis: Structure, function, and signaling pathways // *Cancer Sci.* 2021. T. 112. № 9. С. 3419–3426.
137. Klajnert B. и др. Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185–208 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. T. 364. № 1. С. 20–25.
138. Knauer N. и др. In Vitro Validation of the Therapeutic Potential of Dendrimer-Based Nanoformulations against Tumor Stem Cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. T. 23. № 10. С. 5691.
139. Kong K. Y. и др. MIR-23A microRNA cluster inhibits B-cell development // *Exp. Hematol.* 2010. T. 38. № 8. С. 629–640.e1.
140. Krasheninina O. A. и др. Complexes of pro-apoptotic sirnas and carbosilane dendrimers: Formation and effect on cancer cells // *Pharmaceutics.* 2019. T. 11. № 1.
141. Kumagai S. и др. The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies // *Nat. Immunol.* 2020. T. 21. № 11. С. 1346–1358.
142. Kurkewich J. L. и др. The miR-23a~27a~24-2 microRNA cluster buffers transcription and signaling pathways during hematopoiesis // *PLOS Genet.* 2017. T. 13. № 7. С. e1006887.
143. Kutwin M. и др. MicroRNA Delivery by Graphene-Based Complexes into Glioblastoma Cells // *Molecules.* 2021. T. 26. № 19. С. 5804.
144. Labatut A. E., Mattheolabakis G. Non-viral based miR delivery and recent developments // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. T. 128. № 3. С. 82–90.
145. Labieniec-Watala M., Watala C. PAMAM Dendrimers: Destined for Success or Doomed to Fail? Plain and Modified PAMAM Dendrimers in the Context of Biomedical Applications // *J. Pharm. Sci.* 2015. T. 104. № 1. С. 2–14.
146. las Cuevas N. de и др. In Vitro Studies of Water-Stable Cationic Carbosilane Dendrimers As Delivery Vehicles for Gene Therapy Against HIV and Hepatocarcinoma // *Curr. Med. Chem.* 2012. T. 19. № 29. С. 5052–5061.
147. Lathia J. D. и др. Cancer stem cells in glioblastoma // *Genes Dev.* 2015. T. 29. № 12. С. 1203–1217.
148. Laufs S. и др. Lentiviral vector integration sites in human NOD/SCID repopulating cells // *J. Gene Med.* 2006. T. 8. № 10. С. 1197–1207.
149. Lawrie C. H. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review // *Br. J. Haematol.* 2013. T.

160. № 5. С. 571–581.

150. Lazniewska J. и др. Mechanism of cationic phosphorus dendrimer toxicity against murine neural cell lines // *Mol. Pharm.* 2013. Т. 10. № 9. С. 3484–3496.

151. Lee H., Baker, J. R., Larson R. G. Molecular Dynamics Studies of the Size, Shape, and Internal Structure of 0% and 90% Acetylated Fifth-Generation Polyamidoamine Dendrimers in Water and Methanol // *J. Phys. Chem. B.* 2006. Т. 110. № 9. С. 4014–4019.

152. Lee H. Y. и др. Inhibition of MicroRNA-21 by an antagomir ameliorates allergic inflammation in a mouse model of asthma // *Exp. Lung Res.* 2017. Т. 43. № 3. С. 109–119.

153. Lee S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme // *Genes Dis.* 2016. Т. 3. № 3. С. 198–210.

154. Lei M. M. L., Lee T. K. W. Cancer Stem Cells: Emerging Key Players in Immune Evasion of Cancers // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Т. 9. № June. С. 1–15.

155. Leroux C., Cadore J.-L., Montelaro R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? // *Vet. Res.* 2004. Т. 35. № 4. С. 485–512.

156. Li C. C. и др. Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells // *RNA Biol.* 2013. Т. 10. № 8. С. 1333–1344.

157. Li D. и др. Increases in miR-124-3p in Microglial Exosomes Confer Neuroprotective Effects by Targeting FIP200-Mediated Neuronal Autophagy Following Traumatic Brain Injury // *Neurochem. Res.* 2019a. Т. 44. № 8. С. 1903–1923.

158. Li F. и др. Blocking the CD47-SIRPα axis by delivery of anti-CD47 antibody induces antitumor effects in glioma and glioma stem cells // *Oncoimmunology.* 2018. Т. 7. № 2. С. 1–12.

159. Li G. и др. Decline in miR-181a expression with age impairs T cell receptor sensitivity by increasing DUSP6 activity // *Nat. Med.* 2012. Т. 18. № 10. С. 1518–1524.

160. Li G. и др. Molecular and clinical characterization of TIM-3 in glioma through 1,024 samples // *Oncoimmunology.* 2017a. Т. 6. № 8. С. 1–7.

161. Li Q.-J. и др. miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection // *Cell.* 2007. Т. 129. № 1. С. 147–161.

162. Li Q. и др. Triggering Immune System With Nanomaterials for Cancer Immunotherapy // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. Т. 10.

163. Li T. и др. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF- κ B pathway by regulating expression of the kinase IKK α during macrophage differentiation // *Nat. Immunol.* 2010. Т. 11. № 9. С. 799–805.
164. Li W. и др. MicroRNA Response and Toxicity of Potential Pathways in Human Colon Cancer Cells Exposed to Titanium Dioxide Nanoparticles // *Cancers (Basel)*. 2020. Т. 12. № 5. С. 1236.
165. Li W. (Jess) и др. MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Т. 9.
166. Li X. и др. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Endometrial Cancer Cell Proliferation and Migration through Delivery of Exogenous miR-302a // *Stem Cells Int.* 2019b. Т. 2019. С. 1–11.
167. Li Z.-H. и др. miR-34a expression in human breast cancer is associated with drug resistance // *Oncotarget*. 2017b. Т. 8. № 63. С. 106270–106282.
168. Lin R. и др. Targeting miR-23a in CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression // *J. Clin. Invest.* 2014. Т. 124. № 12. С. 5352–5367.
169. Litak J. и др. PD-L1/PD-1 Axis in Glioblastoma Multiforme // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Т. 20. № 21. С. 5347.
170. Liu Q. и др. miR-155 Regulates Glioma Cells Invasion and Chemosensitivity by p38 Isoforms In Vitro // *J. Cell. Biochem.* 2015. Т. 116. № 7. С. 1213–1221.
171. Liu X. и др. CD47 promotes human glioblastoma invasion through activation of the PI3K/Akt pathway // *Oncol. Res.* 2019. Т. 27. № 4. С. 415–422.
172. Lu L.-F. и др. Foxp3-Dependent MicroRNA155 Confers Competitive Fitness to Regulatory T Cells by Targeting SOCS1 Protein // *Immunity*. 2009. Т. 30. № 1. С. 80–91.
173. Luarte A. и др. Astrocyte-Derived Small Extracellular Vesicles Regulate Dendritic Complexity through miR-26a-5p Activity // *Cells*. 2020. Т. 9. № 4. С. 930.
174. Luo Q. и др. Exosomes from MiR-126-Overexpressing Adscs Are Therapeutic in Relieving Acute Myocardial Ischaemic Injury // *Cell. Physiol. Biochem.* 2017. Т. 44. № 6. С. 2105–2116.
175. Lynn G. M., Laga R., Jewell C. M. Induction of anti-cancer T cell immunity by in situ vaccination using systemically administered nanomedicines // *Cancer Lett.* 2019. Т. 459. С. 192–203.
176. Mamaeva V., Sahlgren C., Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent

advances // Adv. Drug Deliv. Rev. 2013. T. 65. № 5. С. 689–702.

177. Mangeot P.-E. и др. Development of Minimal Lentivirus Vectors Derived from Simian Immunodeficiency Virus (SIVmac251) and Their Use for Gene Transfer into Human Dendritic Cells // J. Virol. 2000. T. 74. № 18. С. 8307–8315.

178. Mann M. и др. An NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses // Nat. Commun. 2017. T. 8. № 1. С. 851.

179. Manna P. P. и др. CD47 Augments Fas/CD95-mediated Apoptosis // J. Biol. Chem. 2005. T. 280. № 33. С. 29637–29644.

180. Martirosyan A., Olesen M. J., Howard K. A. Chitosan-Based Nanoparticles for Mucosal Delivery of RNAi Therapeutics. , 2014. С. 325–352.

181. Maszewska M. и др. Water-Soluble Polycationic Dendrimers with a Phosphoramidothioate Backbone: Preliminary Studies of Cytotoxicity and Oligonucleotide/Plasmid Delivery in Human Cell Culture // Oligonucleotides. 2003. T. 13. № 4. С. 193–205.

182. Mattiske S. и др. The Oncogenic Role of miR-155 in Breast Cancer // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2012. T. 21. № 8. С. 1236–1243.

183. Maute R., Xu J., Weissman I. L. CD47–SIRP α -targeted therapeutics: status and prospects // Immuno-Oncology Technol. 2022. T. 13. С. 100070.

184. Mehta A., Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic // Nat. Rev. Immunol. 2016. T. 16. № 5. С. 279–294.

185. Melamed J. R. и др. Investigating the role of Hedgehog/GLI1 signaling in glioblastoma cell response to temozolomide // Oncotarget. 2018. T. 9. № 43. С. 27000–27015.

186. Milone M. C., O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors // Leukemia. 2018. T. 32. № 7. С. 1529–1541.

187. Miyazaki Y. и др. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2 // Nat. Med. 2012. T. 18. № 7. С. 1136–1141.

188. Möhnle P. и др. MicroRNA-146a controls Th1-cell differentiation of human CD4 + T lymphocytes by targeting PRKC ϵ // Eur. J. Immunol. 2015. T. 45. № 1. С. 260–272.

189. Montini E. и др. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration // Nat. Biotechnol. 2006. T. 24. № 6. С. 687–696.

190. Montini E. и др. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy // *J. Clin. Invest.* 2009. Т. 119. № 4. С. 964–975.
191. Moore T. V. и др. Relationship between CD8-dependent antigen recognition, T cell functional avidity, and tumor cell recognition // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. Т. 58. № 5. С. 719–728.
192. Moraes F. C. и др. Mirna delivery by nanosystems: State of the art and perspectives // *Pharmaceutics*. 2021. Т. 13. № 11. С. 1–20.
193. Munir J., Yoon J. K., Ryu S. Therapeutic miRNA-Enriched Extracellular Vesicles: Current Approaches and Future Prospects // *Cells*. 2020. Т. 9. № 10. С. 2271.
194. Narayan N., Bracken C. P., Ekert P. G. MicroRNA-155 expression and function in AML: An evolving paradigm // *Exp. Hematol.* 2018. Т. 62. С. 1–6.
195. Navarro F., Lieberman J. miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship // *PLoS One*. 2015. Т. 10. № 7. С. e0132767.
196. Nduom E. K. и др. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma // *Neuro. Oncol.* 2016. Т. 18. № 2. С. 195–205.
197. Neudecker V. и др. Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome // *J. Exp. Med.* 2017. Т. 214. № 6. С. 1737–1752.
198. Niccolini B. и др. Opportunities offered by graphene nanoparticles for micrornas delivery for amyotrophic lateral sclerosis treatment // *Materials (Basel)*. 2022. Т. 15. № 1.
199. Noy R., Pollard J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy // *Immunity*. 2014. Т. 41. № 1. С. 49–61.
200. O’Connell R. M. и др. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Т. 104. № 5. С. 1604–1609.
201. O’Connell R. M. и др. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Т. 10. № 2. С. 111–122.
202. O’Connell R. M., Zhao J. L., Rao D. S. MicroRNA function in myeloid biology // *Blood*. 2011. Т. 118. № 11. С. 2960–2969.
203. Okada H., Kohanbash G., Lotze M. T. MicroRNAs in immune regulation—Opportunities for cancer immunotherapy // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. Т. 42. № 8. С. 1256–1261.

204. Onnekink C. и др. Low molecular weight silicones induce cell death in cultured cells // *Sci. Rep.* 2020. Т. 10. № 1. С. 9558.
205. Ortega A. и др. Exosomes as Drug Delivery Systems: Endogenous Nanovehicles for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus // *Pharmaceutics*. 2020a. Т. 13. № 1. С. 3.
206. Ortega M. Á. и др. Dendrimers and Dendritic Materials: From Laboratory to Medical Practice in Infectious Diseases // *Pharmaceutics*. 2020b. Т. 12. № 9. С. 874.
207. Orzan F. и др. Genetic Evolution of Glioblastoma Stem-Like Cells From Primary to Recurrent Tumor // *Stem Cells*. 2017. Т. 35. № 11. С. 2218–2228.
208. Paladini L. и др. Targeting microRNAs as key modulators of tumor immune response // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016. Т. 35. № 1. С. 103.
209. Pan Y. и др. Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles // *FEBS J.* 2012a. Т. 279. № 7. С. 1198–1208.
210. Pan Y. и др. MS2 VLP-based delivery of microRNA-146a inhibits autoantibody production in lupus-prone mice // *Int. J. Nanomedicine*. 2012b. С. 5957.
211. Park J. и др. Effect of combined anti-PD-1 and temozolomide therapy in glioblastoma // *Oncoimmunology*. 2019. Т. 8. № 1. С. 1–11.
212. Pashangzadeh S. и др. Implications the Role of miR-155 in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases // *Front. Immunol.* 2021. Т. 12. № May. С. 1–14.
213. Patsoukis N. и др. Revisiting the PD-1 pathway // *Sci. Adv.* 2020. Т. 6. № 38.
214. Pedroso de Lima M. C. и др. Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Т. 47. № 2–3. С. 277–294.
215. Pedziwiatr-Werbicka E. и др. Carbosilane Dendrimers are a Non-Viral Delivery System for Antisense Oligonucleotides: Characterization of Dendriplexes // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012. Т. 8. № 1. С. 57–73.
216. Piao L. и др. Lipid-based Nanoparticle Delivery of Pre-miR-107 Inhibits the Tumorigenicity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *Mol. Ther.* 2012. Т. 20. № 6. С. 1261–1269.
217. Poeschla E. и др. Identification of a Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Encapsidation Determinant and Transduction of Nondividing Human Cells by HIV-2-Based Lentivirus Vectors // *J. Virol.* 1998. Т. 72. № 8. С. 6527–6536.

218. Poeschla E. M., Wong-Staal F., Looney D. J. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors // *Nat. Med.* 1998. T. 4. № 3. С. 354–357.
219. Poitz D. M. и др. Regulation of the Hif-system by micro-RNA 17 and 20a – Role during monocyte-to-macrophage differentiation // *Mol. Immunol.* 2013. T. 56. № 4. С. 442–451.
220. Posadas I. и др. Highly Efficient Transfection of Rat Cortical Neurons Using Carbosilane Dendrimers Unveils a Neuroprotective Role for HIF-1 α in Early Chemical Hypoxia-Mediated Neurotoxicity // *Pharm. Res.* 2009. T. 26. № 5. С. 1181–1191.
221. Poupot M. и др. Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation // *FASEB J.* 2006. T. 20. № 13. С. 2339–2351.
222. Pourshafie N. и др. Systemic Delivery of MicroRNA Using Recombinant Adeno-associated Virus Serotype 9 to Treat Neuromuscular Diseases in Rodents // *J. Vis. Exp.* 2018. № 138.
223. Pua H. H. и др. MicroRNAs 24 and 27 Suppress Allergic Inflammation and Target a Network of Regulators of T Helper 2 Cell-Associated Cytokine Production // *Immunity.* 2016. T. 44. № 4. С. 821–832.
224. Qiu X. Y. и др. PD-L1 confers glioblastoma multiforme malignancy via Ras binding and Ras/Erk/EMT activation // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2018. T. 1864. № 5. С. 1754–1769.
225. Qu T., Li B., Wang Y. Targeting CD47/SIRP α as a therapeutic strategy, where we are and where we are headed // *Biomark. Res.* 2022. T. 10. № 1. С. 20.
226. Rabinovich G. A., Gabrilovich D., Sotomayor E. M. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells // *Annu. Rev. Immunol.* 2007. T. 25. № 1. С. 267–296.
227. Rasines B. и др. Water-stable ammonium-terminated carbosilane dendrimers as efficient antibacterial agents // *Dalt. Trans.* 2009. № 40. С. 8704.
228. Reddy M. и др. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function // *J. Immunol. Methods.* 2004. T. 293. № 1–2. С. 127–142.
229. Reddy T. L. и др. Simultaneous delivery of Paclitaxel and Bcl-2 siRNA via pH-Sensitive liposomal nanocarrier for the synergistic treatment of melanoma // *Sci. Rep.* 2016. T. 6. № 1. С. 35223.
230. Rogler C. E. и др. MicroRNA-23b cluster microRNAs regulate transforming growth factor-

- beta/bone morphogenetic protein signaling and liver stem cell differentiation by targeting Smads // *Hepatology*. 2009. T. 50. № 2. C. 575–584.
231. Sanz-Ortega L., Rojas J. M., Barber D. F. Improving Tumor Retention of Effector Cells in Adoptive Cell Transfer Therapies by Magnetic Targeting // *Pharmaceutics*. 2020. T. 12. № 9. C. 812.
232. Sathyanarayanan V., Neelapu S. S. Cancer immunotherapy: Strategies for personalization and combinatorial approaches // *Mol. Oncol.* 2015. T. 9. № 10. C. 2043–2053.
233. Sauter A. и др. Effective polyethylene glycol passivation for the inhibition of surface interactions of peripheral blood mononuclear cells and platelets // *Biointerphases*. 2013. T. 8. № 1. C. 14.
234. Schade A. и др. Innovative Strategy for MicroRNA Delivery in Human Mesenchymal Stem Cells via Magnetic Nanoparticles // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. T. 14. № 6. C. 10710–10726.
235. Scheideler M., Vidakovic I., Prassl R. Lipid nanocarriers for microRNA delivery // *Chem. Phys. Lipids*. 2020. T. 226. C. 104837.
236. Schillebeeckx I. и др. T cell subtype profiling measures exhaustion and predicts anti-PD-1 response // *Sci. Rep.* 2022. T. 12. № 1. C. 1342.
237. Schreiber R. D., Old L. J., Smyth M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion // *Science* (80-.). 2011. T. 331. № 6024. C. 1565–1570.
238. Schultz B. R., Chamberlain J. S. Recombinant Adeno-associated Virus Transduction and Integration // *Mol. Ther.* 2008. T. 16. № 7. C. 1189–1199.
239. Seager R. J. и др. Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression // *Converg. Sci. Phys. Oncol.* 2017. T. 3. № 3. C. 034002.
240. Serramía M. J. и др. In vivo delivery of siRNA to the brain by carbosilane dendrimer // *J. Control. Release*. 2015. T. 200. C. 60–70.
241. Sherje A. P. и др. Dendrimers: A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting // *Int. J. Pharm.* 2018. T. 548. № 1. C. 707–720.
242. Silva B. F. B. и др. PEGylated cationic liposome–DNA complexation in brine is pathway-dependent // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2014. T. 1838. № 1. C. 398–412.
243. Simons M., Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. T. 21. № 4. C. 575–581.
244. Simpson L. J. и др. A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine

production // *Nat. Immunol.* 2014. T. 15. № 12. C. 1162–1170.

245. Skinner J. P. J., Keown A. A., Chong M. M. W. The miR-17~92a Cluster of MicroRNAs Is Required for the Fitness of Foxp3⁺ Regulatory T Cells // *PLoS One*. 2014. T. 9. № 2. C. e88997.

246. Solassol J. и др. Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie // *J. Gen. Virol.* 2004. T. 85. № 6. C. 1791–1799.

247. Song Y. и др. Localized injection of miRNA-21-enriched extracellular vesicles effectively restores cardiac function after myocardial infarction // *Theranostics*. 2019. T. 9. № 8. C. 2346–2360.

248. Su L. C. и др. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis // *Int. J. Rheum. Dis.* 2017a. T. 20. № 11. C. 1631–1637.

249. Su M.-J., Aldawsari H., Amiji M. Pancreatic Cancer Cell Exosome-Mediated Macrophage Reprogramming and the Role of MicroRNAs 155 and 125b2 Transfection using Nanoparticle Delivery Systems // *Sci. Rep.* 2016. T. 6. № 1. C. 30110.

250. Su X. W. и др. miR-181d regulates human dendritic cell maturation through NF- κ B pathway // *Cell Prolif.* 2017b. T. 50. № 5. C. e12358.

251. Sun S. и др. Targeting and Regulating of an Oncogene via Nanovector Delivery of MicroRNA using Patient-Derived Xenografts // *Theranostics*. 2017. T. 7. № 3. C. 677–693.

252. Sun X. и др. MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation // *J. Clin. Invest.* 2012.

253. Sun X., Turcan S. From Laboratory Studies to Clinical Trials: Temozolomide Use in IDH-Mutant Gliomas // *Cells*. 2021. T. 10. № 5.

254. Sun Y., Sun Y., Zhao R. Establishment of MicroRNA delivery system by PP7 bacteriophage-like particles carrying cell-penetrating peptide // *J. Biosci. Bioeng.* 2017. T. 124. № 2. C. 242–249.

255. Taganov K. D. и др. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. T. 103. № 33. C. 12481–12486.

256. Tang R., Rangachari M., Kuchroo V. K. Tim-3: A co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance // *Semin. Immunol.* 2019. T. 42. C. 101302.

257. Teunissen A. J. P. и др. Embracing nanomaterials' interactions with the innate immune system // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2021. T. 13. № 6.

258. Thibult M.-L. и др. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation // *Int. Immunol.* 2013. Т. 25. № 2. С. 129–137.
259. Tobias J. и др. Emerging targets for anticancer vaccination: PD-1 // *ESMO Open.* 2021. Т. 6. № 5. С. 100278.
260. Tripp R. A., Mark Tompkins S. Antiviral Effects of Inhibiting Host Gene Expression. , 2014. С. 459–477.
261. Trotta R. и др. miR-155 regulates IFN- γ production in natural killer cells // *Blood.* 2012. Т. 119. № 15. С. 3478–3485.
262. Tse J. и др. Onco-miR-21 Promotes Stat3-Dependent Gastric Cancer Progression // *Cancers (Basel).* 2022. Т. 14. № 2. С. 264.
263. Vacas-Córdoba E. и др. Dendrimers as nonviral vectors in dendritic cell-based immunotherapies against human immunodeficiency virus: steps toward their clinical evaluation // *Nanomedicine.* 2014. Т. 9. № 17. С. 2683–2702.
264. Vandenberghe L., Wilson J. AAV as An Immunogen // *Curr. Gene Ther.* 2007. Т. 7. № 5. С. 325–333.
265. Vannucci L. и др. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. // *New Microbiol.* 2013. Т. 36. № 1. С. 1–22.
266. Vargas-Toscano A. и др. Rapalink-1 targets glioblastoma stem cells and acts synergistically with tumor treating fields to reduce resistance against temozolomide // *Cancers (Basel).* 2020. Т. 12. № 12. С. 1–19.
267. Ventura A. и др. Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters // *Cell.* 2008. Т. 132. № 5. С. 875–886.
268. Verhaak R. G. W. и др. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 // *Cancer Cell.* 2010. Т. 17. № 1. С. 98–110.
269. Viallard J. F. и др. HLA-DR expression on lymphocyte subsets as a marker of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.* 2001. Т. 125. № 3. С. 485–491.
270. Vos K. E. Van Der и др. Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain // *Neuro. Oncol.* 2016. Т. 18. № 1. С. 58–69.

271. Wang B. и др. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors // *Gene Ther.* 2008. Т. 15. № 22. С. 1489–1499.
272. Wang F. и др. Imaging Dendrimer-Grafted Graphene Oxide Mediated Anti-miR-21 Delivery With an Activatable Luciferase Reporter // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016a. Т. 8. № 14. С. 9014–9021.
273. Wang F. и др. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma // *Hepatology.* 2018. Т. 67. № 3. С. 940–954.
274. Wang G. и др. Novel miR-122 delivery system based on MS2 virus like particle surface displaying cell-penetrating peptide TAT for hepatocellular carcinoma // *Oncotarget.* 2016b. Т. 7. № 37. С. 59402–59416.
275. Wang H. и др. Recent progress in microRNA delivery for cancer therapy by non-viral synthetic vectors // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. Т. 81. С. 142–160.
276. Wang N. и др. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles, via miR-210, improve infarcted cardiac function by promotion of angiogenesis // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2017. Т. 1863. № 8. С. 2085–2092.
277. Wang S. и др. Temozolomide promotes immune escape of GBM cells via upregulating PD-L1. // *Am. J. Cancer Res.* 2019. Т. 9. № 6. С. 1161–1171.
278. Wasiak T. и др. Phosphorus Dendrimers Affect Alzheimer's (A β 1–28) Peptide and MAP-Tau Protein Aggregation // *Mol. Pharm.* 2012. Т. 9. № 3. С. 458–469.
279. Wen D. и др. Mesenchymal stem cell and derived exosome as small RNA carrier and Immunomodulator to improve islet transplantation // *J. Control. Release.* 2016. Т. 238. С. 166–175.
280. Whiteside T. L. Exosomes and tumor-mediated immune suppression // *J. Clin. Invest.* 2016. Т. 126. № 4. С. 1216–1223.
281. William D. и др. Temozolomide-induced increase of tumorigenicity can be diminished by targeting of mitochondria in in vitro models of patient individual glioblastoma // *PLoS One.* 2018. Т. 13. № 1. С. 1–14.
282. Wilner S. E., Levy M. Synthesis and Characterization of Aptamer-Targeted SNALPs for the Delivery of siRNA. , 2016. С. 211–224.
283. Wolf Y., Anderson A. C., Kuchroo V. K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. Т. 20. № 3. С. 173–185.

284. Wu D., Wang C. miR-155 Regulates the Proliferation of Glioma Cells Through PI3K/AKT Signaling // *Front. Neurol.* 2020. T. 11. № April.
285. Wu P. и др. Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration // *J. Transl. Med.* 2018. T. 16. № 1. С. 29.
286. Wu Y. и др. Therapeutic Delivery of MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* 2013. T. 2. С. e84.
287. Xiao C. и др. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes // *Nat. Immunol.* 2008. T. 9. № 4. С. 405–414.
288. Xie W. и др. miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages // *PLoS One.* 2013. T. 8. № 3. С. e58639.
289. Xu F. и др. MiR-101 and doxorubicin codelivered by liposomes suppressing malignant properties of hepatocellular carcinoma // *Cancer Med.* 2017. T. 6. № 3. С. 651–661.
290. Xu H., Jia S., Xu H. Potential therapeutic applications of exosomes in different autoimmune diseases // *Clin. Immunol.* 2019. T. 205. С. 116–124.
291. Xu J.-R. и др. Development of fullerene nanospherical miRNA and application in overcoming resistant breast cancer // *Mater. Today Chem.* 2022. T. 26. С. 101019.
292. Yamanaka R., Hayano A. Secondary glioma following acute lymphocytic leukemia: therapeutic implications // *Neurosurg. Rev.* 2017. T. 40. № 4. С. 549–557.
293. Yang H.-Y. и др. MicroRNA-17 Modulates Regulatory T Cell Function by Targeting Co-regulators of the Foxp3 Transcription Factor // *Immunity.* 2016. T. 45. № 1. С. 83–93.
294. Yang L. и др. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice // *J. Exp. Med.* 2012. T. 209. № 9. С. 1655–1670.
295. Yang M. и др. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells // *Mol. Cancer.* 2011. T. 10. № 1. С. 117.
296. Yang N. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA // *Int. J. Pharm. Investig.* 2015. T. 5. № 4. С. 179.
297. Yao Y. и др. Using a Novel MicroRNA Delivery System to Inhibit Osteoclastogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. T. 16. № 12. С. 8337–8350.
298. Ye D. и др. MiR-138 Promotes Induced Pluripotent Stem Cell Generation Through the

Regulation of the p53 Signaling // *Stem Cells*. 2012. T. 30. № 8. С. 1645–1654.

299. Ye S.-B. и др. Exosomal miR-24-3p impedes T-cell function by targeting FGF11 and serves as a potential prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma // *J. Pathol*. 2016. T. 240. № 3. С. 329–340.

300. Ye S. и др. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma // *Oncotarget*. 2014. T. 5. № 14. С. 5439–5452.

301. Ye X. и др. Targeted Delivery of Mutant Tolerant Anti-Coxsackievirus Artificial MicroRNAs Using Folate Conjugated Bacteriophage Phi29 pRNA // *PLoS One*. 2011. T. 6. № 6. С. e21215.

302. Yin Y. и др. Tumor-secreted miR-214 induces regulatory T cells: a major link between immune evasion and tumor growth // *Cell Res*. 2014. T. 24. № 10. С. 1164–1180.

303. Ying X. и др. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages // *Oncotarget*. 2016. T. 7. № 28. С. 43076–43087.

304. Zang K. и др. TIM-3 as a Prognostic Marker and a Potential Immunotherapy Target in Human Malignant Tumors: A Meta-Analysis and Bioinformatics Validation // *Front. Oncol*. 2021. T. 11. № February. С. 1–12.

305. Zare H. и др. Carbon Nanotubes: Smart Drug/Gene Delivery Carriers // *Int. J. Nanomedicine*. 2021. T. Volume 16. С. 1681–1706.

306. Zerneck A. и др. Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection // *Sci. Signal*. 2009. T. 2. № 100.

307. Zhang H. и др. Cell-derived microvesicles mediate the delivery of miR-29a/c to suppress angiogenesis in gastric carcinoma // *Cancer Lett*. 2016. T. 375. № 2. С. 331–339.

308. Zhang H. и др. Clinical characterization, genetic profiling, and immune infiltration of TOX in diffuse gliomas // *J. Transl. Med*. 2020a. T. 18. № 1. С. 1–16.

309. Zhang J. и др. Tim-3 expression in glioma cells is associated with drug resistance // *J. Cancer Res. Ther*. 2019. T. 15. № 4. С. 882.

310. Zhang K. и др. IL-10 as an Indicator for Predicting Clinical Progression in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients // *Clin. Lab*. 2021. T. 67. № 10/2021.

311. Zhang L., Liao Y., Tang L. MicroRNA-34 family: A potential tumor suppressor and therapeutic

candidate in cancer // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2019. T. 38. № 1. C. 1–13.

312. Zhang N. и др. Downregulated expression of miR-223 promotes Toll-like receptor-activated inflammatory responses in macrophages by targeting RhoB // Mol. Immunol. 2017. T. 91. C. 42–48.

313. Zhang P. и др. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy // Front. Mol. Biosci. 2020b. T. 7.

314. Zhang Y. и др. Efficacy and Safety of PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors versus Anti-PD-1/PD-L1 Combined with Other Therapies for Tumors: A Systematic Review // Cancers (Basel). 2023. T. 15. № 3. C. 682.

315. Zhang Y., Wang Z., Gemeinhart R. A. Progress in microRNA delivery // J. Control. Release. 2013. T. 172. № 3. C. 962–974.

316. Zhang Y., Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications // Cell. Mol. Immunol. 2020. T. 17. № 8. C. 807–821.

317. Zheng J. и др. MicroRNA-23b promotes tolerogenic properties of dendritic cells in vitro through inhibiting Notch1/NF- κ B signalling pathways // Allergy. 2012. T. 67. № 3. C. 362–370.

318. Zhou M. и др. Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203 // Cell. Immunol. 2014. T. 292. № 1–2. C. 65–69.

319. Zhou R. и др. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells // Nucleic Acids Res. 2010. T. 38. № 10. C. 3222–3232.

320. Zhou Y. и др. Exosomes from Endothelial Progenitor Cells Improve the Outcome of a Murine Model of Sepsis // Mol. Ther. 2018. T. 26. № 5. C. 1375–1384.

321. Zhu J. и др. TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein // Sci. Rep. 2017. T. 7. № 1. C. 12239.

322. Zinselmeyer B. H. и др. PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis // J. Exp. Med. 2013. T. 210. № 4. C. 757–774.