

## ВЛИЯНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ОКСАЛИПЛАТИНА *IN VITRO*

Пашкина Е.А.<sup>1,2</sup>, Быкова М.В.<sup>1</sup>, Беришвили М.Т.<sup>2</sup>, Чжан И.М.<sup>3</sup>,  
Козлов В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения  
РФ, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Нанькайский университет, Тяньцзинь, Китай

**Резюме.** Одним из современных подходов к терапии онкозаболеваний является создание систем адресной доставки противоопухолевых препаратов, что позволяет увеличить концентрацию доставляемого вещества в нужном месте и препятствовать его накоплению в здоровых органах и тканях. При этом можно также ожидать повышения продолжительности и эффективности действия препаратов, а также снизить побочные эффекты при проведении терапии. Рецептор гиалуроновой кислоты CD44, который, согласно литературным данным, высоко экспрессируется при многих видах опухолей и регулирует метастазирование, является перспективной мишенью для осуществления адресной доставки противоопухолевых препаратов. Целью данного исследования была оценка влияния супрамолекулярной системы доставки на основе гиалуроновой кислоты с наноразмерным кавитантом циклодекстрином на противоопухолевые свойства оксалиплатина *in vitro*. В качестве опухолевых клеток были использованы клеточные линии 1301, SK-MEL-28 и B16. Клетки культивировались в присутствии системы доставки на основе гиалуроновой кислоты (HACD), оксалиплатина (OX) и их комплекса (HACD-OX) в различных концентрациях в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 0,3% L-глутамина, 4% гентамицина и 10% инактивированной сыворотки FBS в течение 48 часов во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C. Оценка влияния исследуемых соединений на жизнеспособность клеточных культур проводилась с помощью WST-теста. Было показано, что в случае клеточной линии Т-клеточной лимфомы 1301 система доставки HACD не влияла на способность OX снижать жизнеспособность опухолевых клеток данной линии, действие свободного оксалиплатина

### Адрес для переписки:

Пашкина Екатерина Александровна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 227-01-35.  
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

### Address for correspondence:

Ekaterina A. Pashkina  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
14 Yadrintsevskaya St  
Novosibirsk  
630099 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 227-01-35.  
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

### Образец цитирования:

Е.А. Пашкина, М.В. Быкова, М.Т. Беришвили,  
И.М. Чжан, В.А. Козлов «Влияние супрамолекулярной  
системы доставки на основе гиалуроновой кислоты  
с циклодекстрином на противоопухолевые свойства  
оксалиплатина *in vitro*» // Медицинская иммунология,  
2024. Т. 26, № 5. С. 1079-1084.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOA-16814

© Пашкина Е.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.A. Pashkina, M.V. Bykova, M.T. Berishvili, Y.M. Zhang,  
V.A. Kozlov "Effect of a supramolecular delivery system  
based on hyaluronic acid with cyclodextrin on the antitumor  
properties of oxaliplatin *in vitro*", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5,  
pp. 1079-1084.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOA-16814

© Pashkina E.A. et al., 2024

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOA-16814

и комплекса было сопоставимым. Однако в случае клеток меланомы (B16 и SK-MEL-28) комплекс HACD-DOX оказывает более выраженное противоопухолевое действие, вызывая статистически значимое снижение жизнеспособности клеток линии B16 и SK-MEL-28 по сравнению со свободным оксалиплатином. Таким образом, система доставки на основе гиалуроновой кислоты и циклодекстрина способна усиливать *in vitro* противоопухолевое действие оксалиплатина.

**Ключевые слова:** адресная доставка, гиалуроновая кислота, циклодекстрин, CD44, противоопухолевые свойства, оксалиплатин

## EFFECT OF A SUPRAMOLECULAR DELIVERY SYSTEM BASED ON HYALURONIC ACID WITH CYCLODEXTRIN ON THE ANTITUMOR PROPERTIES OF OXALIPLATIN *IN VITRO*

Pashkina E.A.<sup>a, b</sup>, Bykova M.V.<sup>a</sup>, Berishvili M.T.<sup>b</sup>, Zhang Y.M.<sup>c</sup>, Kozlov V.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Nankai University, Tianjin, China

**Abstract.** One of the modern approaches to the treatment of cancer is the creation of targeted delivery systems for anticancer drugs, which allows increasing the concentration of the delivered substance in the right place and preventing its accumulation in healthy organs and tissues. At the same time, one can also expect an increase in the duration and effectiveness of the drugs, as well as a reduction in side effects during therapy. The hyaluronic acid receptor CD44, which, according to the literature, is highly expressed in many types of tumors and regulates metastasis, is a promising target for targeted delivery of anticancer drugs. The purpose of this study was to evaluate the effect of a supramolecular delivery system based on hyaluronic acid with nanosized cavitand cyclodextrin on the antitumor properties of oxaliplatin *in vitro*. Cell lines 1301, SK-MEL-28 and B16 were used as tumor cells. Cells were cultured in the presence of a delivery system based on hyaluronic acid (HACD), oxaliplatin (OX), and their complex (HACD-OX) at various concentrations in complete culture medium RPMI-1640 containing 0.3% L-glutamine, 4% gentamicin and 10% inactivated FBS serum for 48 hours in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The effect of the studied compounds on the viability of cell cultures was assessed using the WST test. It was shown that in the case of the T-cell lymphoma cell line 1301, the HACD delivery system did not affect the ability of OX to reduce the viability of tumor cells of this line; the effect of free oxaliplatin and the complex was comparable. However, in the case of melanoma cells (B16 and SK-MEL-28), the HACD-DOX complex has a more pronounced antitumor effect, causing a statistically significant decrease in the viability of B16 and SK-MEL-28 cells compared to free oxaliplatin.

**Keywords:** targeted delivery, hyaluronic acid, cyclodextrin, CD44, antitumor properties, oxaliplatin

Выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта РНФ № 23-25-00375.

### Введение

Одним из современных и активно развивающихся направлений на стыке химии, фармакологии и онкологии является так называемая супрамолекулярная химиотерапия, основанная на возможности формирования комплексов по типу «гость-хозяин» [2, 3, 8, 13]. Макроцикли-

ческие соединения, такие как кукурбитурилы, циклодекстрины, каликсарены и пр., являются идеальными платформами для построения химиотерапевтических платформ посредством супрамолекулярных взаимодействий, поскольку они содержат полости контролируемого размера, в которые могут проникать молекулы-«гости» [1, 11]. Супрамолекулярная химиотерапия, объединяющая нековалентные взаимодействия и традиционную химиотерапию, продемонстрировала ряд преимуществ, к примеру возможность повы-

шать растворимость и стабильность препаратов, снизить побочные эффекты, а также может быть использована для адресной доставки лекарств.

Как известно, суть адресной доставки состоит в том, что само лекарственное вещество, а чаще средство его доставки (вектор, контейнер) модифицируются молекулами, узнающими структуры на клетках-мишенях. В случае супрамолекулярных систем доставки в качестве лиганда может служить гиалуроновая кислота, участвующая в построении молекулярного каркаса данной системы [7, 9]. Гиалуроновая кислота способна связываться с различными рецепторами на поверхности клетки, в частности CD44, экспрессирующимся на высоком уровне на стволовых и опухолевых клетках. CD44 участвует в развитии и прогрессировании гематологических неоплазий за счет усиления апоптотической резистентности, инвазивности, а также регуляции хоуминга костного мозга и мобилизации иницирующих лейкемию клеток в периферическую кровь [5]. Повышенный уровень экспрессии CD44 может служить маркером худшего прогноза при большинстве злокачественных новообразований.

Комбинация гиалуроновой кислоты и макроциклов может не только поддерживать способность гиалуроновой кислоты нацеливаться на определенную мишень, но также наделять супрамолекулярную систему способностью доставлять химиотерапевтические препараты посредством множественных взаимодействий «гость-хозяин». Известно также и о иных системах доставки на основе гиалуроновой кислоты, в том числе в виде наночастиц и наногелей [4, 6]. Кроме того, конъюгат гиалуроновой кислоты и паклитаксела (Oncofid-P) в данный момент проходит III фазу клинических испытаний в качестве препарата для терапии злокачественной мезотелиомы.

## Материалы и методы

Супрамолекулярная система доставки на основе циклодекстрина (CD) и гиалуроновой кислоты (HA) была любезно предоставлена сотрудником Химического колледжа Нанькайского университета профессором Ин-Мин Чжаном (Тяньцзинь, Китай). Синтез, очистка и оценка физико-химических свойств данной системы доставки (HACD) осуществлялись аналогично протоколу, описанному ранее при использовании данной системы доставки для адиплатина [10]. Оксалиплатин (OX) использовали в концентрациях 40, 10, 2 и 0,5 мкг/мл. HACD добавляли к OX в пропорции 10:1.

Линия клеток 1301 Т-клеточного лейкоза человека была приобретена из Европейской

коллекции аутентифицированных клеточных культур, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Германия. Клетки меланомы линии B16 (меланома мыши) и SK-MEL-28 (меланома человека) были любезно предоставлены д.м.н., проф. С.В. Сенниковым (лаборатория молекулярной иммунологии НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия).

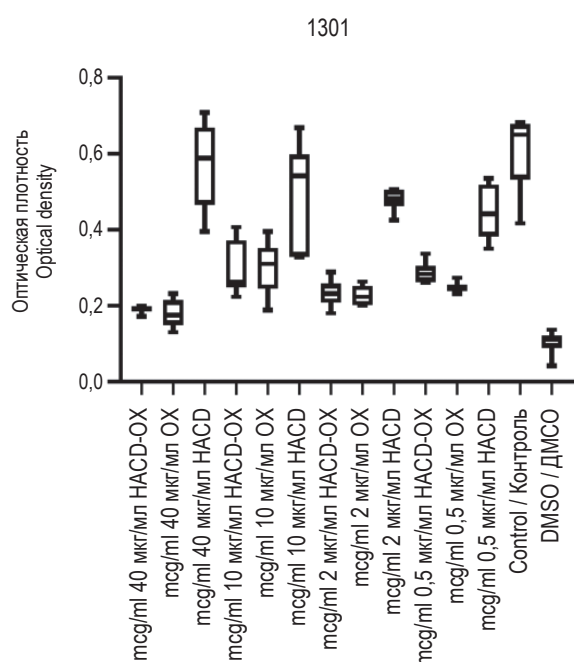
Клетки культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, культивировали в 96-либо 48-луночных планшетах в питательной среде RPMI-1640, содержащей 0,3% L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина, 25 мкг/мл тиенама и 10% инактивированной сыворотки FCS, в присутствии исследуемых соединений в течение 48 часов. Культивирование клеток проводили в присутствии в разных концентрациях оксалиплатина (OX), HACD и HACD-OX. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. В качестве дополнительного контроля использовался 10%-ный DMSO, вызывающий в культуре гибель клеток в данной концентрации.

Оценку жизнеспособности клеточных культур *in vitro* проводили с помощью WST-теста: через 48 часов после культивирования, при этом к пробам добавляли по 10 мкл WST-1 и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе еще в течение 4 часов. После жизнеспособность оценивали в соответствии с протоколом производителя по количеству полученного формазанового красителя путем измерения оптической плотности спектрофотометрически на мультимодальном планшетном ридере LB 941 TriStar фирмы Berthold Technologies (Германия) на длине волны 450 нм, при этом измерение на длине волны 620 нм использовалось в качестве референса.

Все экспериментальные данные выражались в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM) или медианы с межквартильным размахом в случае непараметрического распределения данных. Анализ проводился с помощью GraphPad Prism 9.3.1 с использованием OnewayANOVA для параметрических выборок либо теста Фридмана с применением теста Данна в случае непараметрических выборок для множественных сравнений. Значение  $p < 0,05$  считалось минимальным критерием для статистической значимости.

## Результаты и обсуждение

При оценке влияния OX в свободной форме и в виде комплекса HACD-OX на жизнеспособность опухолевых клеток линии 1301 было показано, что комплекс и свободный препарат приводили к снижению жизнеспособности клеток данной линии, достоверных различий между



**Рисунок 1. Оценка жизнеспособности клеток линии 1301 при сокультивировании с нагруженной оксалиплатином супрамолекулярной системой доставки на основе гиалуроновой кислоты**

**Примечание.** Данные представлены в виде графиков «ящик с усами»: границы ящиков соответствуют 25-му и 75-му процентилю, горизонтальная линия соответствует медиане, усы простираются от максимума до минимума.

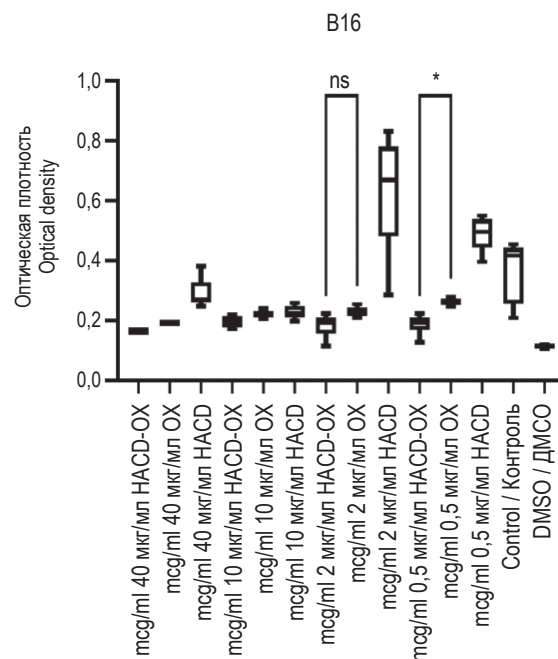
Figure 1. Assessment of the viability of 1301 cells when co-cultured with an oxaliplatin-loaded supramolecular hyaluronic acid-based delivery system

Note. Data are presented as box-and-whisker plots: box boundaries represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, the horizontal line represents the median, and the whiskers extend from maximum to minimum.

действием ОХ и HACD-OX, содержащего эквивалентное количество оксалиплатина, обнаружено не было (рис. 1).

Следующим этапом нами проводилась оценка комплекса HACD-OX и свободного оксалиплатина на жизнеспособность клеток меланомы (меланомы человека SK-MEL-28 и мышиной меланомы B16). HACD-OX и ОХ приводили к снижению жизнеспособности клеток линии SK-MEL-28 (рис. 2), при этом в концентрации оксалиплатина 10 мкг/мл препарат в комплексе оказывал более выраженный эффект по сравнению со свободным препаратом. В остальных исследуемых концентрациях достоверных различий между ОХ и HACD-OX не было показано.

В случае клеток меланомы мыши B16 (рис. 3) было показано, что комплекс HACD-OX силь-



**Рисунок 2. Оценка жизнеспособности клеток линии B16 при сокультивировании с нагруженной оксалиплатином супрамолекулярной системой доставки на основе гиалуроновой кислоты**

**Примечание.** Данные представлены в виде графиков «ящик с усами»: границы ящиков соответствуют 25-му и 75-му процентилю, горизонтальная линия соответствует медиане, усы простираются от максимума до минимума. \* указывает на статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ), ns указывает на отсутствие статистически значимых различий.

Figure 2. Assessing the viability of B16 cells when co-cultured with an oxaliplatin-loaded hyaluronic acid-based supramolecular delivery system

Note. Data are presented as box-and-whisker plots: box boundaries represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, the horizontal line represents the median, and the whiskers extend from maximum to minimum. \* indicates statistically significant differences ( $p < 0.05$ ), ns indicates no statistically significant differences.

нее подавляет жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению со свободным ОХ в самой низкой концентрации 0,5 мкг/мл, в остальных концентрациях ОХ и HACD-OX одинаково снижают жизнеспособность данных клеток. Таким образом, было продемонстрировано, что HACD не снижает способность ОХ подавлять жизнеспособность опухолевых клеток. При этом в случае меланомы HACD-OX оказывал более выраженное противоопухолевое действие, достоверно сильнее снижая жизнеспособность клеток.

Схожий подход с использованием систем доставки использовала другая группа авторов, взяв-



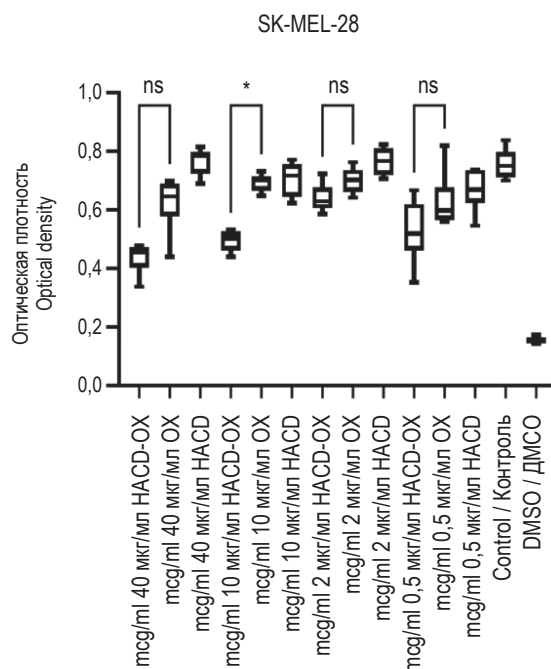
шая за основу наночастицы, нагруженные доксорубицином (DOX) [12]. Поверхность частиц была модифицирована гиалуроновой кислотой для осуществления адресной доставки. Было показано, что доксорубин, инкапсулированный в наночастицы гиалуроновой кислоты, поперечно сшитые с липоевой кислотой (LACHA-DOX), опосредовал высокоэффективное и целенаправленное ингибирование опухолевых клеток человека, включая множественную миелому человека LP-1 и острый миелоидный лейкоз человека AML-2, при ксенотрансплантации клеток в организм мышей линии nude. Следовательно, подобные результаты говорят об эффективности действия систем доставки на основе гиалуроновой кислоты с противоопухолевыми препаратами.

## Выводы

Нами была проведена оценка супрамолекулярной системы доставки, нагруженной оксалиплатином, на трех различных опухолевых линиях — 1301, B16 и SK-MEL. Было показано, что HACD-DOX оказывает более выраженное противоопухолевое действие, подавляя жизнеспособность клеток меланомы (B16 и SK-MEL) по сравнению со свободным оксалиплатином. Таким образом, система доставки на основе гиалуроновой кислоты и циклодекстрина усиливает противоопухолевое действие оксалиплатина.

## Список литературы / References

1. Appel E.A., Barrio J.D., Loh X.J., Scherman O.A. Supramolecular polymeric hydrogels. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, Vol. 41, pp. 6195-6214.
2. Chen Y., Jing L., Meng Q., Li B., Chen R., Sun Z. Supramolecular chemotherapy: noncovalent bond synergy of cucurbit[7]uril against human colorectal tumor Cells. *Langmuir*, 2021, Vol. 37, no. 31, pp. 9547-955.
3. Chen Y., Sun Z. Supramolecular chemotherapy based on the host-guest complex of lobaplatin-cucurbit[7]uril. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2020, Vol. 3, no. 4, pp. 2449-2454.
4. Choi K.Y., Saravanakumar G., Park J.H., Park K. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2012, Vol. 99, pp. 82-94.
5. Hertweck M.K., Erdfelder F., Kreuzer K.A. CD44 in hematological neoplasias. *Ann. Hematol.*, 2011, Vol. 90, no. 5, pp. 493-508.
6. Salari N., Mansouri K., Valipour E., Abam F., Jaymand M., Rasoulpoor S., Dokaneheifard S., Mohammadi M. Hyaluronic acid-based drug nanocarriers as a novel drug delivery system for cancer chemotherapy: A systematic review. *Daru*, 2021, Vol. 2, pp. 439-447.
7. Singh P., Chen Y., Tyagi D., Wu L., Ren X., Feng J., Carrier A., Luan T., Tang Y., Zhang J., Zhang X.  $\beta$ -Cyclodextrin-grafted hyaluronic acid as a supramolecular polysaccharide carrier for cell-targeted drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 2021, Vol. 602, 120602. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120602.
8. Wang J., Wang D., Cen M., Jing D., Bei J., Huang Y., Zhang J., Lu B., Wang Y., Yao Y. GOx-assisted synthesis of pillar[5]arene based supramolecular polymeric nanoparticles for targeted/synergistic chemo-chemodynamic cancer therapy. *J. Nanobiotechnol.*, 2022, Vol. 20, 33. doi: 10.1186/s12951-021-01237-0.
9. Xiong Q., Cui M., Bai Y., Liu Y., Liu D., Song T. A supramolecular nanoparticle system based on  $\beta$ -cyclodextrin-conjugated poly-l-lysine and hyaluronic acid for co-delivery of gene and chemotherapy agent targeting hepatocellular carcinoma. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2017, Vol. 155, pp. 93-103.



**Рисунок 3. Оценка жизнеспособности клеток линии SK-MEL-28 при сокультивировании с нагруженной оксалиплатином супрамолекулярной системой доставки на основе гиалуроновой кислоты**

Примечание. См. примечание к рисунку 2.

Figure 3. Assessment of the viability of SK-MEL-28 cells when co-cultured with an oxaliplatin-loaded supramolecular delivery system based on hyaluronic acid

Note. As for Figure 2.

10. Yang Y., Zhang Y.M., Chen Y., Chen J.T., Liu Y. Targeted polysaccharide nanoparticle for adamplatin prodrug delivery. *J. Med. Chem.*, 2013, Vol. 56, no. 23, pp. 9725-9736.
11. Yu G., Jie K., Huang F. Supramolecular amphiphiles based on host-guest molecular recognition motifs. *Chem. Rev.*, 2015, Vol. 115, no. 15, pp. 7240-7303.
12. Zhong Y., Meng F., Deng C., Mao X., Zhong Z. Targeted inhibition of human hematological cancers in vivo by doxorubicin encapsulated in smart lipoic acid-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles. *Drug Deliv.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 1482-1490.
13. Zhou J., Yu G., Huang F. Supramolecular chemotherapy based on host-guest molecular recognition: a novel strategy in the battle against cancer with a bright future. *Chem. Soc. Rev.*, 2017, Vol. 46, pp. 7021-7053.

---

**Авторы:**

**Пашкина Е.А.** — заведующая внебюджетной лабораторией регуляции иммунного ответа ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; доцент кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Быкова М.В.** — лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Беришвили М.Т.** — студентка ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Чжан И.М.** — PhD, профессор, кафедра химии, Нанькайский университет, Тяньцзинь, Китай

**Козлов В.А.** — д.м.н., академик РАН, профессор, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

---

**Authors:**

**Pashkina E.A.**, Head, Extra-Budgetary Laboratory for Regulation of the Immune Response, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

**Bykova M.V.**, Research Assistant, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Berishvili M.T.**, Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

**Zhang Y.M.**, PhD, Professor, Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin, China

**Kozlov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024  
Отправлена на доработку 08.04.2024  
Принята к печати 10.04.2024

---

Received 31.03.2024  
Revision received 08.04.2024  
Accepted 10.04.2024